

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/30455 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 38/58**,  
31/00, 38/06, 38/07, 38/05, 38/04, 31/365, 31/704,  
31/4015, 31/407, 31/415, 31/336, 31/5375, 31/47, 31/166,  
A61P 31/12, 31/20, 31/18, 31/14, 25/28, 43/00, 35/00,  
1/16 // A61K 48/00

Ortsstrasse Nr. 51, 07407 Uhlstädt (DE). **HOHENBERG**,  
Heinz [DE/DE]; Schillerstrasse 23, 22767 Hamburg (DE).

(74) Anwalt: **WEHLAN**, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1,  
10315 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03908

(22) Internationales Anmeldedatum:  
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 51 716.1 12. Oktober 2000 (12.10.2000) DE  
101 49 398.3 3. Oktober 2001 (03.10.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **SCHUBERT**, Ulrich [DE/DE]; Ortsstrasse Nr.  
51, 07407 Uhlstädt (DE). **WILL**, Hans [DE/DE]; Paul-  
Sorge-Strasse 60a, 22549 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **TESSMER**, Uwe  
[DE/DE]; Roonstrasse 39, 20253 Hamburg (DE). **SIRMA**,  
Hüseyin [DE/DE]; Beethovenstrasse 3/8, 69168 Wiesloch  
(DE). **PRASSLOW**, Alexij [RU/DE]; Münsterstrasse  
34, 22529 Hamburg (DE). **SCHUBERT**, Evelyn [DE/DE];

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: AGENTS FOR THE TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON VIRUS-INFEKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to agents for the treatment of viral infections, in particular, infections with hepatitis and retro-viruses. Said agents inhibit the release, maturation and replication of both retro-viruses and also hepatitis viruses. In the example of human immune deficiency virus (HIV) and hepatitis-B viruses it has been shown that proteasome inhibitors block the release of virus particles and the infectiousness of the released viral particles and thus the reproduction of the viruses. The proteasome inhibitors affect the activities in the ubiquitin/proteasome pathway, in particular the enzymatic activities of the 26S and the 20S proteasome complexes. The application for the above invention lies in anti-retroviral therapy, particularly the treatment of HIV infections and AIDS and in the anti-viral therapy of hepatitis infections, in particular the treatment of acute and chronic HBV and HCV infections and the associated liver carcinomas.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen, insbesondere von Infektionen mit Hepatitis- und Retroviren. Gegenstand der Erfindung sind Mittel zur Hemmung der Freisetzung, der Reifung und der Replikation sowohl von Retroviren als auch von Hepatitisviren. Am Beispiel der Humanen Immundefizienzviren (HIV) und von Hepatitis-B-Viren wird gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von Viruspartikeln sowie die Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel und damit die Virusvermehrung blockieren. Die Proteasom-Inhibitoren beeinflussen die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pa-thway, insbesondere die enzymatischen Aktivitäten des 26S und des 20S Proteasom-Komplexes. Die Anwendung der Erfindung liegt in der anti-retrovirale Therapie, speziell der Behandlung von HIV-Infektionen und AIDS, sowie in der anti-viralen Therapie von Hepatitis-Infektionen, speziell der Behandlung von akuten und chronischen HBV- und HCV-Infektionen und damit assoziierter Leberkarzinome.

WO 02/30455 A2

## Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen, insbesondere von Infektionen mit Hepatitis- und Retroviren. Gegenstand der Erfindung sind Mittel – die als Wirkstoff Proteasom-Inhibitoren enthalten – zur Hemmung der Freisetzung, der Reifung, der Infektiosität und somit der Replikation sowohl von Retroviren als auch von Hepatitisviren. Am Beispiel der Humanen Immundefizienzviren des Typs 1 und 2 (HIV-1/HIV-2) wird gezeigt, dass diese Mittel sowohl die Prozessierung der HIV-1 und HIV-2 Gag-Proteine als auch die Freisetzung von HIV-1 und HIV-2 Viruspartikeln sowie die Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel und dadurch die HIV-Virusreplikation blockieren.

Weiterhin können diese Mittel für die Behandlung, Therapie und Hemmung einer Virushepatitis verwendet werden. Es wird gezeigt, dass die Anwendungen dieser Mittel zur Freisetzung von nicht infektiösen Hepatitisviren aus infizierten Zellen führen. Diese Mittel können daher die Ausbreitung einer akuten Infektion mit Hepatitisviren begrenzen. Des weiteren sind die Mittel für nicht proliferierende Hepatozyten weniger toxisch als für Non-Parenchymzellen der Leber und Leberkarzinomzellen. Damit sind diese Mittel für eine bevorzugte Zerstörung von Leberkarzinomzellen in mit HBV (Hepatitis-B-Viren, Abkürzungsverzeichnis hinter den Beispielen) und HCV (Hepatitis-C-Viren) infizierten Patienten und Tieren geeignet. Bei den Mitteln handelt es sich um verschiedene Substanzklassen, welchen gemeinsam ist, dass sie das Ubiquitin-Proteasom-System inhibieren. Speziell sind diese Mittel dadurch charakterisiert, dass diese Substanzen, die Proteasom-Inhibitoren, die Aktivität der hauptsächlichen zellulären Protease, das ist das Proteasom, in den behandelten Zellen inhibieren. Am Beispiel des Enten-Hepatitisvirus wie auch des humanen Hepatitis-B-Virus wird gezeigt, dass die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von infektiösen Enten-Hepatitisviren und humanen Hepatitis-B-Viren aus bereits infizierten Hepatozyten drastisch reduzieren (gezeigt am Beispiel des Enten-Hepatitisvirus). Die Proteasom-Inhibitoren können daher die Virämie sowohl bei einer Neuinfektion als auch bei chronischen Infektionen mit Hepatitisviren unterdrücken, und der Erfolg einer Viruseliminierung durch das eigene Immunsystem und/oder durch bekannte Mittel mit ähnlicher oder anderer Wirkung kann erhöht werden. Die Folgen einer HBV- und HCV-Infektion – wie z.B. Leberschädigungen unterschiedlichen Schweregrades bis hin zur

häufig tödlich verlaufenden fulminanten Hepatitis, Entwicklung einer Leberzirrhose/Fibrose und eines Leberkarzinoms - können durch den Einsatz dieser Mittel, den Proteasom-Inhibitoren, verhindert, gemindert oder revertiert werden. Anwendungsgebiete für diese Erfindungen sind somit die anti-retrovirale Therapie und die Vorbeugung bei Infektionen mit Immundefizienz verursachenden Lentiviren, speziell die erworbene Immundefizienz bei Tieren und Menschen, insbesondere von HIV-1-/ HIV-2-Infektionen und AIDS, wie auch die anti-virale Therapie von Hepatitisvirus-Infektionen, insbesondere zur Verhinderung der Etablierung sowie der Aufrechterhaltung einer akuten und chronischen HBV- und HCV-Infektion.

10

## **Charakteristik des bekannten Standes**

### **0. Einleitung**

Seit Anfang der 80er Jahre hat die Pandemie des erworbenen Immundefizienzsyndroms (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) Millionen von HIV-infizierten Menschen mit einer heimtückischen, multisystemischen und ultimativ bislang unheilbaren Krankheit konfrontiert. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist weder eine wirksame Strategie zur Vakzinierung gegen HIV bekannt, noch sind andere Mechanismen der Stimulation einer nach wie vor wenig verstandenen natürlichen Immunität gegenüber einer HIV-Infektion für eine breite Anwendung applizierbar. Für die Therapie einer bereits etablierten HIV-Infektion oder zum Schutz vor einer systemischen Manifestierung einer HIV-Infektion unmittelbar nach Aufnahme des Virus sind verschiedene anti-retrovirale Medikamente im Einsatz. Diese stellen im wesentlichen Substanzen dar, welche die viralen Enzyme Reverse Transkriptase (RT) sowie Protease (PR) hemmen. Neben dem Problem der Unverträglichkeit besteht die hauptsächliche Limitierung dieser Medikamente in der enormen, bis  $10^6$ -Mal höheren Mutationsrate (verglichen mit der Replikation humaner DNA) von HIV. Der dadurch bedingte Polymorphismus führt unweigerlich und in relativ kurzer Zeit zum Auftreten von HIV-Mutanten, die gegenüber einzelnen oder sogar kombinierten anti-HIV-Therapeutika, insbesondere der HAART-Therapie (highly active antiretroviral therapy - Patentschrift WO 00/33654), resistent sind. Das Ziel der weiteren HIV-Forschung besteht damit in der Identifizierung von zellulären Angriffspunkten ("Targets") für eine anti-retrovirale Therapie. Dies betrifft zelluläre Faktoren, Enzyme oder komplexe Mechanismen, die für die Replikation von HIV in der Wirtszelle essentiell sind und selektiv manipuliert werden können, ohne die Vitalität des Gesamtorganismus wesentlich zu beeinträchtigen. Diesen Anspruch erfüllt die überraschende Feststellung, welche in dieser Erfindung beschrieben wird, und zwar, dass die Mittel, die Proteasom-Inhibitoren, späte Prozesse in der Replikation von HIV-1 und HIV-2

inhibieren und dadurch die Freisetzung und die Formierung von infektiösen Nachkommenviren verhindern.

Die Infektion mit Hepatitis-B-Viren (ca. 5% der Weltbevölkerung sind betroffen) und Hepatitis-  
5 C-Viren (ca. 3% der Weltbevölkerung sind betroffen) gehört neben HIV/AIDS-Problematik zu  
den großen Weltgesundheitsproblemen. Infektionen mit HBV oder HCV haben häufig einen  
chronischen Virus-Trägerstatus zur Folge. Zu den Krankheitssymptomen der Infektionen  
gehören Leberentzündungen verschiedener Schweregrade bis hin zum Leberversagen  
(fulminante Hepatitis), ein erhöhtes Risiko der Entwicklung einer Leberzirrhose und Fibrose  
10 sowie die Entstehung von Leberkarzinomen. Neuinfektionen mit HBV können relativ effizient,  
aber wegen der Existenz von Impfversagern und Immunescape-Varianten nicht komplett, durch  
eine prophylaktische Immunisierung verhindert werden. Für eine HCV-Neuinfektion gibt es  
bisher keinen Impfschutz. Trotz der Vielzahl von Medikamenten für die Therapie einer  
chronischen HCV- und HBV-Infektion, die alle mit Nebenwirkungen belastet sind und im  
15 wesentlichen aus Zytokinen (Interferon alpha und Varianten hiervon) sowie Nukleosidanaloga  
bestehen, ist es bisher nicht möglich, die Mehrzahl der chronischen Träger von HBV und HCV  
zufriedenstellend zu therapieren, da entweder die Patienten nicht ansprechen auf die  
Medikamente oder nur kurzzeitige Besserung eintritt und in der Regel das Virus durch die  
Behandlung nicht vollständig eliminiert werden kann. Auch die passive Gabe von HBV-  
20 spezifischen neutralisierenden Antikörpern und/oder Nukleosidanaloga oder anderen  
Medikamenten bei Lebertransplantierten verhindert in der Regel nicht die Neuinfektion der  
transplantierten Leber. Immunsuppression von Patienten mit abklingenden Hepatitiden kann zur  
Reaktivierung von latent vorhandenen Viren führen. Das Hauptproblem bei Nukleosidanaloga  
ist die hohe Mutationsrate sowohl von HBV als auch von HCV, wodurch sich Medikamenten-  
25 resistente Virusstämme während der Behandlung entwickeln. Um die Probleme der bisher  
verfügbaren antiviralen und therapeutischen Mittel für die Hepatitis B und C zu umgehen, sind  
neue Therapieansätze notwendig, welche - ähnlich der anti-retroviralen Therapie - konservierte  
zelluläre Faktoren beeinflussen, die für die Vermehrung dieser Viren in der Wirtszelle essentiell  
sind. Solche Mittel werden in dieser Erfindung beschrieben. Und zwar betrifft dies die  
30 überraschende Erkenntnis, dass Proteasom-Inhibitoren - ähnlich der neuartigen Effekte auf  
Retroviren - ebenfalls die Produktion von infektiösen Hepatitisviren verhindern und dabei  
gleichzeitig das Absterben von Lebertumorzellen induzieren. Diese Mittel, die Proteasom-  
Inhibitoren, sind wegen der Möglichkeit, diese bevorzugt in die Leber zu transportieren,

besonders für die selektive Therapie von viralen Lebererkrankungen und Leberkarzinomen geeignet (Literaturverzeichnis hinter den Ausführungsbeispielen).

### 1. Funktion des Ubiquitin/Proteasom-Pathway

- 5 Proteasomen sind multikatalytische und multi-Subunit Enzymkomplexe, die ca. 1% des Gesamt-Zellproteins darstellen und als die hauptsächliche proteolytische Komponente im Zellkern und Zytoplasma aller eukaryontischen Zellen vorkommen. Die wesentliche Funktion von Proteasomen ist die Proteolyse von missgefalteten, nicht-funktionellen oder für den schnellen Abbau bestimmten, in der Regel regulatorischen Proteinen. Eine weitere Funktion des proteasomalen
- 10 Abbaus einer Vielzahl von zellulären oder viralen Proteinen ist die Generierung von Peptidliganden für Major Histocompatibilitäts (MHC) Klasse-I-Moleküle, welche für die T-Zell-vermittelte Immunantwort notwendig ist (für Review siehe Rock und Goldberg, 1999).

- Proteasom-Targets werden in der Regel für den proteasomalen Abbau durch die Anheftung von oligomeren Formen von Ubiquitin (Ub) markiert. Ub ist ein hochkonserviertes, 76 Aminosäuren langes Protein, das kovalent an Targetproteine *via* Isopeptidbindung zwischen dem COOH-Terminus und der  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe von Lysin-Seitenketten gekoppelt wird, entweder am Targetprotein oder an Ub-Moleküle, die bereits an das Targetprotein geheftet sind. Das Ergebnis der Konjugation von Ub-Molekülen ist die Formierung von sogenannten poly-Ub-Ketten.
- 20 Allgemein sind Multimere von vier Ub-Molekülen notwendig, um als Signal für den Abbau durch das Proteasom zu fungieren. Die Ubiquitinierung selbst ist reversibel, und Ub-Moleküle können durch eine Vielzahl von Ub-Hydrolasen von dem Targetmolekül wieder entfernt werden. Die Verbindung zwischen der Ubiquitinierung von Targetproteinen und der proteasomalen Proteolyse wird allgemein als Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) bezeichnet (für Review siehe
- 25 Hershko und Ciechanover, 1998; Baumeister *et al.*, 1998).

- Das 26S Proteasom ist ein 2.5 Megadalton (MDa) großer Multienzymkomplex, welcher aus ca. 31 Untereinheiten besteht (für Review siehe Voges *et al.*, 1999). Die proteolytische Aktivität des Proteasom-Komplexes wird durch eine core-Struktur, dem 20S Proteasom, realisiert. Das 20S
- 30 Proteasom bildet einen aus 14 nicht identischen Proteinen (im Molekulargewichtsbereich von 21 bis 31 kDa) bestehenden komplizierten Multienzymkomplex, der in zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Ringen in einer  $\alpha\beta\beta\alpha$ -Reihenfolge angeordnet ist (für Review siehe Voges *et al.*, 1999). Die Substratspezifität des 20S Proteasom umfasst drei wesentliche proteolytische Aktivitäten: Trypsin-, Chymotrypsin- und Postglutamyl-Peptid hydrolysierende- (PGPH), oder auch Kaspase-

ähnliche Aktivitäten, welche in den  $\beta$ -Untereinheiten Z, Y und X lokalisiert sind. Die enzymatische Aktivitäten des 20S Proteasoms werden durch Anlagerung der 19S regulatorischen Untereinheiten gesteuert, welche zusammen das aktive 26S Proteasom-Partikel bilden. Die 19S regulatorischen Untereinheiten sind bei der Erkennung von poly-ubiquitinierten Proteinen sowie bei der Entfaltung von Targetproteinen beteiligt. Die Aktivität des 26S Proteasom ist ATP-abhängig und degradiert fast ausschließlich nur poly-ubiquitinierte Proteine. Die katalytisch aktiven  $\beta$ -Untereinheiten des 20S-Proteasoms (X, Y und Z) können durch  $\gamma$ -Interferon induzierbare MHC-kodierte Untereinheiten ausgetauscht werden, die dann das sogenannte "Immuno-Proteasom" bilden (Gaczynska *et al.*, 1993).

### 1.1. Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Pathogenese klinisch relevanter Krankheiten

Die enge Verknüpfung des UPS (Ubiquitin-Proteasom-System) mit zellulären Mechanismen erklärt die Bedeutung dieses Systems für zahlreiche pathologische Mechanismen, von denen bislang nur ein geringer Teil bekannt ist (für Review siehe Schwartz und Ciechanover, 1999). Eine zentrale Funktion übt das UPS bei Erkrankungen des Immunsystems aus. Zum einen ist der 26S Proteasom-Komplex die hauptsächliche Protease in der MHC-I-Antigenprozessierung, und zum anderen kann die Aktivität des Proteasoms selbst sowohl durch  $\gamma$ -Interferon induzierbare katalytische  $\beta$ -Untereinheiten manipuliert werden. Viele entzündliche und immunologische Krankheiten stehen im Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, welcher verschiedene Gen-Funktionen in der Immunantwort reguliert. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die durch Ubiquitinierung und spezifische Spaltung eines Vorläuferproteins durch das Proteasom gesteuert wird, führt zur erhöhten Expression von verschiedenen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, entzündlichen und Stress-Response-Proteinen sowie Immunrezeptoren (für Review siehe Chiechanover *et al.*, 2000; Schwartz und Ciechanover, 1999).

### 1.2. Proteasom-Inhibitoren

Verschiedene Substanzklassen sind als Proteasom-Inhibitoren bekannt. Es sind zum einen chemisch modifizierte Peptidaldehyde wie der Tripeptidaldehyd N-carbobenzoxyl-L-leucinyll-L-leucinyll-L-leucinal (zLLL), das auch als MG132 bezeichnet wird sowie das um den Faktor 10 wirksamere Borsäure-Derivat MG232. Das zLLL und davon abgeleitete Derivate blockieren das Proteasom reversibel durch Ausbildung einer transienten Hemiacetal-Struktur mit der katalytisch aktiven Threonin-Hydroxyl-Seitenkette in Position 1 der  $\beta$ -Untereinheit des 26S

Proteasoms (für Review siehe Coux *et al.*, 1996). Ähnlich zu zLLL wurde eine weitere Klasse von modifizierten Peptiden als Proteasom-Inhibitoren, Peptid-Vinyl-Sulfone, beschrieben (Bogyo *et al.*, 1997).

Natürlich vorkommende Substanzen, isoliert aus Mikroorganismen, sind Lactacystin (LC) (Fenteany *et al.*, 1995) aus Streptomyceten sowie Epoxomicin aus Aktinomyzeten (Meng *et al.*, 1999a,b). LC ist ein hoch spezifischer und wirksamer Proteasom-Inhibitor, welcher das Proteasom durch Transesterifizierung und Alkylierung der Threonin-Seitenkette in der  $\beta$ -Untereinheit irreversibel inaktiviert (Fenteany *et al.*, 1995). LC ist daher ein irreversibler, kovalent wirkender Proteasom-Inhibitor, welcher hauptsächlich die Chymotrypsin- und die Trypsin-ähnlichen Aktivitäten des 26S Proteasom-Partikels blockiert (Fenteany *et al.*, 1995). LC hat keine Peptid-Grundstruktur, sondern besteht aus einem  $\gamma$ -Lactam-Ring, einem Cystein und einer Hydroxy-butyl-Gruppe. LC selbst inhibiert nicht das Proteasom. Vielmehr wird in wässriger Lösung der N-Acetyl-Cystein-Rest hydrolysiert. Das Resultat ist die Bildung eines Clastolactacystein  $\beta$ -Lactons. Diese Lacton-Struktur ist in der Lage, Zellmembranen zu penetrieren. Nach Zellaufnahme kommt es zum nukleophilen Angriff des  $\beta$ -Lacton-Rings und anschließender Transesterifizierung der Threonin<sup>1</sup>-Hydroxyl-Gruppe der  $\beta$ -Untereinheit.

Ein weiterer Proteasom-Inhibitor ist das natürlich vorkommende Epoxyketon Epoxomicin. Hinsichtlich der Spezifität für das 26S Proteasom und Wirksamkeit ist Epoxomicin der bislang wirksamste von allen bekannten natürlich vorkommenden Proteasom-Inhibitoren (Meng *et al.*, 1999a,b). Weiterhin zeichnet sich Epoxomicin durch eine vergleichsweise geringe Toxizität in Zellkulturen aus (Hanada *et al.*, 1992).

Eine weitere und sehr potente Klasse an synthetischen Proteasom-Inhibitoren sind Borsäure-Peptid-Derivate, insbesondere die Verbindung Pyranozyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure mit dem Namen "PS-341". PS-341 ist sehr stabil unter physiologischen Bedingungen und ist bioverfügbar nach intravenöser Applikation (Adams und Stein, 1996; Adams *et al.*, 1998). Borsäure-Peptid-Derivate sind allgemein bekannt als Inhibitoren verschiedenster eukaryotischer Proteasen, wie zum Beispiel Thrombin, Elastase, Dipeptidylprotease IV (für Review siehe Adams und Stein, 1996). Die besondere Wirksamkeit von PS-341 als Proteasom-Inhibitor wird durch die sehr stabile Bindung zwischen Borsäure- und Hydroxyl-Gruppe der katalytisch aktiven Seitenkette von Thr<sup>1</sup> in der aktiven  $\beta$ -Untereinheit des 20S-Proteasoms mit einer inhibitorischen Konstante ( $K_i$ ) von 0.6 nM realisiert (Adams und Stein, 1996). Außer dem Proteasom ist bislang keine zelluläre Protease bekannt, welche durch PS-341 beeinflusst wird.

Andere, zu PS-341 ähnliche Borsäure-Peptid-Derivate wurden als Proteasom-Inhibitoren beschrieben, wie zum Beispiel Benzoyl-Phenylalanin-Borsäure-Leucin (Gardner *et al.*, 2000). Ebenfalls wurde ein stark potenter Proteasom-Inhibitor mit der Bezeichnung "PS-273" (Morpholin-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) beschrieben, welcher eine ähnliche Grundstruktur wie PS-341 hat, jedoch N-terminal eine Morpholin-Struktur aufweist, dadurch mehr hydrophob ist und vermutlich somit leichter Membranen penetrieren kann als PS-341 (Adams *et al.*, 1999).

#### 10 Klinische Applikation von Proteasom-Inhibitoren

Der Proteasom-Komplex übt essentielle Zellfunktionen aus und ist für die Zellvitalität unverzichtbar. Die permanente Hemmung der Proteasom-Aktivität kann daher zu Veränderungen in der Regulation des Zellzyklus, der Transkription, der gesamten zellulären Proteolyse sowie der MHC-I Antigenprozessierung führen (für Review siehe Hershko und Ciechanover, 1998).

15 Vollständige Inhibierung der Proteasom-Aktivität führt allgemein zu Zellzyklusarrest und Zelltod. Eine dauerhafte Inhibierung aller enzymatischen Aktivitäten des Proteasoms ist mit dem Leben einer Zelle und somit des Gesamtorganismus nicht vereinbar.

Es zeigt sich jedoch, dass neuartige reversibel wirkende Proteasom-Inhibitoren selektiv einzelne proteolytische Aktivitäten des 26S Proteasoms inhibieren, ohne dabei andere zelluläre Proteasen zu beeinflussen. Die Zytotoxizität solcher Inhibitoren ist daher wesentlich geringer im Vergleich zu den relativ unspezifisch wirkenden Proteasom-Inhibitoren, wie zum Beispiel dem Peptidaldehyd zLLL. Diese Tatsache erlaubt sowohl die *in vivo* Anwendung solcher neuartigen Proteasom-Inhibitoren (Meng *et al.*, 1999a) als auch die Etablierung von permanenten Zelllinien, welche relativ hohe Konzentrationen an Proteasom-Inhibitoren tolerieren (Glas *et al.*, 1998; Geier *et al.*, 1999).

Der Anspruch, dass bestimmte Proteasom-Inhibitoren in einem bestimmten Dosis-Regime *in vivo* verträglich sein können, wurde mehrfach gezeigt. Beispielsweise wurde die Selektion von Maus-Thymus-Zelllinien beschrieben, welche die ständige Anwesenheit von 10 µM des Proteasom-Inhibitors z-Leuzinyl-Leuzinyl-Leuzinyl-vinylsulfon (NLVS) tolerieren und dabei normales Zellwachstum und Zellmetabolismus mit gleichzeitig eingeschränkter MHC-I-Antigenpräsentation besitzen (Glas *et al.*, 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem sehr



potenten Proteasom-Inhibitor LC erzielt, der bis zu 6  $\mu$ M in Zellkultur toleriert wurde (Geier *et al.*, 1999).

Epoxomicin, ein Epoxy- $\beta$ -aminoketon modifiziertes Peptid, wurde als eine völlig neuartige Klasse von Proteasom-Inhibitoren aus *Aktinomyceten* isoliert (Hanada *et al.*, 1992). Epoxomicin besitzt eine starke zytotoxische Wirkung gegen verschiedene *in vitro* kultivierte Tumorzelllinien und zeigte im Maus-Modell *in vivo* inhibitorische Aktivität gegen Melanom- und Leukämie-Modelltumore (Hanada *et al.*, 1992).

Die Bedeutung von Proteasom-Inhibitoren als ein neues therapeutisches Prinzip hat in den vergangenen Jahren eine zunehmende Aufmerksamkeit erfahren, insbesondere bei Behandlung von Krebs und entzündlichen Erkrankungen (für Review siehe Murray und Norbury, 2000; Rivett und Gardner, 2000 - Kategorie XXX = Literatur-Stellen nach dem Prioritätsdatum). Bislang ist der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren für die breite klinische Anwendung am Menschen noch nicht zugelassen. Es mehren sich jedoch Berichte in der Fachliteratur, dass in jüngster Zeit die pharmazeutische Industrie intensiv an der Entwicklung von neuen Medikamenten auf der Basis von *in vivo*-verträglichen Proteasom-Inhibitoren arbeitet. Einige Beispiele seien hierzu angeführt: Die Firma "Millennium Pharmaceuticals, Inc." (Cambridge, MA 02139, USA) arbeitet nach Übernahme der Firma "ProScript, Inc." an der Entwicklung von Proteasom-Inhibitoren für entzündungshemmende, immunmodulatorische und antineoplastische Therapien, insbesondere an Borsäure-Derivaten von Di-Peptiden. Dabei spielen die Verbindungen PS-341 (Gardner *et al.*, 2000 Kategorie XXX), PS-519 und PS-273 (Adams *et al.*, 1998, 1999) eine besondere Rolle.

Die orale Applikation von PS-341 hat im Ratten-Modell eine entzündungshemmende Wirkung in Streptokokken-induzierter Polyarthrititis und Leber-Entzündung (Palombella *et al.*, 1998). Im Maus-Modell zeigt PS-341 anti-neoplastische Wirkung gegen Lungenkarzinom und hat außerdem eine additive Wirkung in Verbindung mit Zytostatika (Teicher *et al.*, 1999). *In vitro* Versuche demonstrieren eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber soliden humanen Ovarien- und Prostata-Tumorzellen (Frankel *et al.*, 2000). Phase I klinische Studien an PS-341 beweisen eine gute Bio-Verfügbarkeit und pharmakokinetisches Verhalten (Lightcap *et al.*, 2000 Kategorie XXX).

PS-341 ist der bislang einzige klinisch erprobte Proteasom-Inhibitor. Dazu wurden Phase I und Phase II klinische Studien in Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen, wie zum Beispiel hämatologischen Malignancies als soliden Tumoren bereits abgeschlossen. Die Informationen dazu wurden in verschiedenen Pressemitteilungen von Millennium

5 Pharmaceuticals Inc. vorgestellt:

- Zum Beispiel wurden Ergebnisse über Phase II klinische Studien in Multiple Myeloma-Patienten berichtet (Presse-Mitteilung von Millennium Pharmaceuticals, Inc. von 01.03.01: "Millennium Initiates Phase II Clinical Trials of LDP-341 in Multiple Myeloma." Publiziert auf Webseite

10 <http://biz.yahoo.com/prnews/010301/neth003.html>, Kategorie XXX).

- Erste vorklinische Studien über die Wirkung von Proteasom-Inhibitoren PS-341 als neue anti-Krebsbehandlung in Myelom-Patienten wurde auf dem 42. Meeting der Amerikanischen Hämatologischen Gesellschaft, Dezember 2000, San Francisco, CA, USA, vorgestellt (Presse-Mitteilung von Millennium Pharmaceuticals, Inc. von 04.12.00: Millennium's LDP(PS)-341

15 inhibits growth and induces death of cancer cells, appears to overcome chemotherapy resistance. Publiziert auf Webseite

<http://biz.yahoo.com/prnews/010301/neth003.html>, Kategorie XXX).

- Auf dem Meeting der Amerikanischen Gesellschaft für Klinische Onkologie, im Mai 2000, wurden Daten über Phase I klinische Studien mit PS-341 in Patienten mit fortgeschrittenen

20 malignen Tumoren (einschließlich Melanoma, Nierenkarzinom, Lungenkarzinom, Prostata-Krebs, Ovarien-Krebs, Blasen-Krebs, Cervix-Krebs, Endometrialen und Gallen-Tumoren) vorgestellt. Es wurde keine dosis-limitierende Toxizität durch die Behandlung mit PS-341 beobachtet. Aufgrund der erstaunlichen Wirkung von PS-341 in Bezug auf anti-neoplastische Wirkung und Induktion von Apoptose konnten therapeutische Effekte in verschiedenen Tumor-

25 Patienten beobachtet werden (Presse-Mitteilung von Millennium Pharmaceuticals, Inc. von 23.05.00: "Millennium presents clinical trial data on LDP-341 for advanced malignancies." Publiziert auf Webseite

[http://www.mlnm.com/releases.pr052300\\_1.shtml](http://www.mlnm.com/releases.pr052300_1.shtml)).

- Weitere Informationen über das klinische Protokoll von Phase I Studien in Patienten mit

30 fortgeschrittenen Tumoren (solide Tumore als auch Lymphoma), welche auf Standard-Chemotherapie nicht mehr angesprochen haben, wurden im "CancerNet" online publiziert ("Phase I study of PS-341 in patients with advanced solid tumors or lymphomas". Publiziert am 11.09.00 auf Webseite <http://cancernet.nci.nih.gov/>, Kategorie XXX).

- Ergebnisse über Phase I klinische Studien mit PS-341 in Patienten mit akuter Leukämie, Myelodysplastischem Syndrom und chronischer Myelider Leukämie wurden berichtet, dabei insbesondere die synergistische Wirkung von PS-341 mit Standard Chemotherapeutika (Presse-Mitteilung von Millennium Pharmaceuticals, Inc." vom 09.11.00: "Phase I study of PS-341 in  
5 acute leukemias, myelodysplastic syndromes and chronic myeloid leukemia in blast phase." Publiziert online in Leukemia Insights Newsletter auf Webseite <http://www3.manderson.org/leukemia/insight/letter52.html>).

In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass der Proteasom-Inhibitor PS-519 (ein  $\beta$ -Lacton-Derivat), entwickelt von der Firma Millennium Pharmaceuticals, Inc., eine starke anti-inflammatorische Wirkung ausübt, und zwar in beiden, der verzögerten als auch der über-sensitiven Entzündungsreaktion. In niedrigen Dosen ist PS-519 auch wirksam in Kombination mit Steroiden. PS-519 wurde daher als ein neues Medikament für die Asthma-Behandlung vorgeschlagen (Elliott *et al.*, 1999). Eine weitere Anwendung für PS-519 ergibt sich im Infarkt-  
15 Modell: Die inflammatorische Reaktion nach cerebralen Verletzungen wurde durch PS-519 dramatisch reduziert. Danach scheint PS-519 ebenfalls ein interessantes Pharmakon für die Behandlung von Gehirnschlag zu sein (Phillips *et al.*, 2000, Kategorie XXX).

Da Proteasom-Inhibitoren einen essentiellen Pathway im Zellmetabolismus treffen, ist ein  
20 strenges Dosis-Regime notwendig, um toxische Neben-Effekte zu unterdrücken. Im Rahmen der Entwicklung von *in vivo* verträglichen Proteasom-Inhibitoren wurden verschiedene Peptid-Borsäure-Derivate getestet, welche sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell anti-Tumor Wirkung zeigten (Adams und Stein, 1996; Adams *et al.*, 1998, 1999, 2000). *In vitro* besitzt PS-341 eine selektive zytotoxische Aktivität gegen ein breites Spektrum an humanen  
25 Tumorzelllinien (Adams *et al.*, 1999). Diese Aktivität ist mit der Akkumulation von p21 und Zellzyklus-Arrest in der G2-M-Phase mit nachfolgender Apoptose verbunden (Adams *et al.*, 1999). Direkte Injektion von PS-341 bewirkte das Absterben von 70% der untersuchten Tumoren im Maus-Modell. Nach intravenöser Verabreichung von PS-341 verteilte sich die Substanz in allen Organen und Geweben und hatte anti-neoplastische Aktivität in humanen  
30 Xenograft-Modellen (Adams *et al.*, 1999).

Über den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren jeglicher Substanzklasse mit dem Ziel, virale Infektionen zu blockieren, wurde bislang nicht berichtet. Ein Anspruch auf Blockierung/Hemmung des Replikationszyklus von HIV-1, HIV-2 oder anderen Lentiviren oder

gar der Behandlung von AIDS-Patienten mittels Reagenzien, die das UPS beeinflussen, regulieren oder blockieren, wurde in der Literatur bisher nicht erhoben.

### 1.3. Verbindung zwischen dem Ubiquitin/Proteasom-Pathway und dem Replikationszyklus 5 von Retroviren

#### 1.3.1. Biologie von Retroviren

Die Familie der Retroviren, zu der auch die Humanen Immundefizienzviren (HIV) gehören, zählt zu der großen Gruppe von eukaryontischen retrotransposablen Elementen (für Review  
10 siehe Doolittle *et al.*, 1990). Diese zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, unter Verwendung des Enzyms Reverse Transkriptase RNA-Genome in DNA-Intermediate umzuschreiben. Retroviren werden in fünf Subfamilien untergliedert: (i) Spumaviren; (ii) Mammalian C-Typ Oncoviren; (iii) BLV (Bovine Leukemia Virus)/HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) Leukämieviren; (iv) eine heterogene Gruppe aus RSV (Rous Sarcoma Virus), A, B und D-Typ Viren; sowie (v)  
15 Lentiviren (für Review siehe Doolittle *et al.*, 1990).

Lentiviren replizieren vorrangig in Lymphozyten und ausdifferenzierten Makrophagen und verursachen in der Regel lang andauernde und meist unheilbare Krankheiten. Retroviren beinhalten mindestens drei charakteristische Gene: *gag* (gruppenspezifisches Antigen), *pol*  
20 (Polymerase) und *env* (Hüllproteine). Außer Struktur- und enzymatisch aktiven Virusproteinen kodieren verschiedene Retroviren zusätzliche, in der Regel kleine Proteine mit regulatorischen Funktionen. Neben HIV zählen zu der Subfamilie der Lentiviren SIV (Simian Immunodeficiency Virus), EIAV (Equine Infectious Anemia Virus), BIV (Bovine Immunodeficiency Virus), FIV (Feline Immunodeficiency Virus) und Visna-Virus. HIV  
25 wiederum wird in die zwei Subtypen HIV-1 und HIV-2 untergliedert (für Review siehe Doolittle *et al.*, 1990).

#### 1.3.2. Replikationszyklus von HIV

Der Replikationszyklus von HIV beginnt mit der Bindung des Virus an verschiedene  
30 Zellrezeptoren, unter denen das Glykoprotein CD4 als der primäre Rezeptor sowie verschiedene zellspezifische Chemokin-Rezeptoren als Co-Rezeptoren nach Bindung an CD4 fungieren. Nach Viruseintritt wird das virale RNA-Genom mittels Reverser Transkriptase (RT), RNase H und Polymerase in doppelsträngige DNA umgeschrieben, welche dann in Assoziation mit dem Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert und als Provirusgenom in chromosomale

DNA mittels viraler Integrase eingebaut wird. Nach Transkription und Translation werden Gag/Gag-Pol-Polypoteine sowie Hüllproteine an die Zellmembran transportiert, wo die Assemblierung von Virionen erfolgt. Nach Budding und Abschnürung reifen Viruspartikel durch proteolytische Prozessierung der Gag/Gag-Pol-Polypoteine (für Review siehe Swanstrom und Wills, 1997).

### 1.3.3. Assemblierung, Freisetzung und Reifung von HIV-Partikeln

Die Hauptkomponenten der HIV-Strukturproteine werden in Form von drei Polypoteinen translatiert: Gag und Gag-Pol für die inneren Core-Proteine und viralen Enzyme sowie Env für die viralen Hüllproteine. Im Falle von HIV-1 resultiert die vollständige proteolytische Prozessierung des Gag Polypoteins Pr55 in der Formierung des Matrix (MA), des Capsid (CA) sowie des Nucleocapsids (NC) und des C-terminalen p6<sup>gag</sup> Proteins. HIV-1 Virionen werden generell als unreife nicht-infektiöse Viruspartikel von der Plasmamembran abgeschnürt, dieser Prozess wird als Virusbudding bezeichnet. Unmittelbar nach oder auch während des Buddings beginnt mit der Aktivierung von PR die proteolytische Prozessierung von Gag und Gag-Pol-Polypoteinen. Die proteolytische Reifung der Virionen geht einher mit morphologischen Veränderungen. Charakteristisch dabei ist die Kondensierung des inneren Cores, welche in der Formierung eines für das reife Virus typischen kegelförmigen Core-Zylinders resultiert (für Review siehe Swanstrom und Wills, 1997).

### 1.3.4. Ubiquitin/Proteasom-Pathway und Retrovirus-Replikation

Informationen über die Bedeutung des UPS für bestimmte Abschnitte der HIV-Replikation sind ebenfalls bekannt: Das System wird zum einen für die Proteolyse von neusynthetisierten Virusrezeptor CD4 genutzt. Dieser Pathway wird durch das HIV-1-spezifische Protein Vpu vermittelt, das CD4 aus der Membran des endoplasmatischen Retikulum (ER) in die proteasomale Degradation im Zytoplasma leitet (Schubert *et al.*, 1998). Weiterhin liegen Hinweise vor, dass nach Viruseintritt Proteasomen Gag-Proteine abbauen und dadurch die Infektiosität eindringender HIV-Partikel reduzieren (Schwartz *et al.*, 1998). Außerdem wurden mono-ubiquitinierte Formen von Gag für HIV-1 und Mo-MuLV Gag Proteine beschrieben (Ott *et al.*, 1998).

Obwohl die katalytischen Aktivitäten des 26S Proteasoms vollständig verschieden von der sehr spezifischen Aspartat-Protease-Aktivität der HIV-1/HIV-2 viralen Proteasen sind, wurde beobachtet, dass ein spezifischer Inhibitor der HIV-1 Protease mit der Bezeichnung "Ritonavir" (jedoch kein anderer der bislang bekannten HIV-Protease-Hemmer) die Chymotrypsin-Aktivität

des 20S Proteasoms *in vitro* (Schmidtke *et al.*, 1999) sowie die Proteasom-vermittelte MHC-I-Antigenexpression *in vivo* (André *et al.*, 1998) hemmen kann. Ausgehend von diesem in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen Phänomen wurde von Bryant *et al.* (2000) eine Patentanmeldung hinterlegt, die auf die Verwendung von HIV-1 Protease-Inhibitoren als Proteasom-Inhibitoren in der Behandlung von Krebs, von entzündlichen Erkrankungen und von nicht-HIV verwandten Infektionen gerichtet ist (WO 00/33654). Der Gegenstand der vorliegenden Anmeldung wird davon nicht berührt.

## 2. Biologie von Hepatitisviren

### 2.1. Humane und Animale Hepatitis-B-Viren

Es sind neben dem humanen HBV eine Vielzahl von verwandten Tierviren bekannt, die zusammen die Familie der sogenannten Hepadnaviren bilden (für Review siehe Schäfer *et al.*, 1998). Gemeinsam ist diesen Viren die Synthese einer pregenomischen RNA von einer zirkulären supergecoilten Form des Genomes (cccDNA) im Zellkern, Verpackung einer prägenomischen RNA im Zytoplasma in Nukleokapside, Überschreibung der prägenomischen RNA innerhalb des Kapsids in eine zirkuläre partiell doppelsträngige DNA-Form (ocDNA) mit Hilfe der Virus-kodierten reversen Transkriptase mit DNA-Polymerase Aktivität während der Virusreifung und -ausschleusung. Wegen der zahlreichen Gemeinsamkeiten mit HBV werden die animalen Hepadnaviren sehr häufig als Tiermodelle zur Erforschung der Biologie, Pathogenese und Evaluation von antiviralen Substanzen für die Therapie der humanen Hepatitis B verwendet (für Review siehe Schäfer *et al.*, 1998). Deshalb wurde in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung insbesondere das Entenhepatitis-B-Virus-Tiermodell für Studien mit Proteasom-Inhibitoren eingesetzt.

#### 2.1.1. Hepadnavirale Viruspartikel und Komponenten

Im Serum von virämischen Patienten und Tieren findet man neben dem infektiösen Virion (ca. 42 nm Durchmesser) in der Regel 1.000 bis 10.000 mehr subvirale, nicht infektiöse Partikel von sphärischer oder filamentöser Form. Die viralen Partikel bestehen aus einer Lipidhülle, in welche HBV-Genom-kodierte Oberflächenproteine (HBs oder S, PreS1 oder large S, PreS2 oder middle S) eingelagert sind. Das Nukleokapsid besteht aus dem Nukleokapsidprotein und enthält das partiell doppelsträngige Virusgenom sowie zelluläre Proteine. Dazu gehören unter anderem zelluläre Kinasen.

### 2.1.2. Die frühen Infektionsvorgänge bei Hepadnaviren

Nach Bindung der viralen Partikel an Oberflächenmoleküle der Hepatozyten und andere Zellen hepatischen und nicht-hepatischen Ursprungs wird das Virus über wenig verstandene Mechanismen in die Zellen und das Virusgenom in den Zellkern transportiert. Jeder der Vorgänge der frühen Schritte der Infektion, bei denen die Wechselwirkung mit zellulären Komponenten eine Rolle spielt, könnte in Proteasom-behandelten Zellen gestört sein und so die fehlende oder geringere Infektiosität von Virionen erklären, welche in der vorliegenden Erfindung überraschenderweise festgestellt wurde. Während oder nach Eintritt des viralen Genoms in den Zellkern wird es zu einem komplett doppelsträngigen supergecoilten DNA-Genom (cccDNA) umgewandelt. Von der cccDNA werden alle viralen RNAs synthetisiert. n subgenomischen RNA synthetisiert. Die Genomüberlängen-RNA ist terminal redundant und wird aAußer der Prägenom-RNA werden subgenomische RNAs synthetisiert, von denen die Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine translatiert werden.

### 2.1.3. Die späten Schritte der Hepadnavirus-Replikation

Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Coreproteins spielen eine wichtige Rolle für den Zusammenbau des Nukleokapsids, für die DNA-Synthese, für die Assoziation der Nukleokapsidproteine an die Kernmembran und deren Transport in den Zellkern, sowie für den Zerfall des Nukleokapsids, welcher notwendig ist, um das Genom in den Zellkern zu transportieren. Veränderungen in der Phosphorylierung des Nukleokapsids können mit der Infektiosität der Hepadnaviren und dem Infektionsvorgang interferieren. Hat die DNA-Synthese einen bestimmten Reifezustand erreicht, kommt es zur Umhüllung des Virus. Ein Teil der Nukleokapside wandert zur Kernmembran und sorgt so für die notwendige Erhöhung der Kopienzahl der cccDNA.

### 2.1.4 Das Problem der Heterogenität von Hepadnaviren

Wegen des Schrittes der reversen Transkription des HBV-Genoms in DNA und des Fehlens einer Proofreadingfunktion der reversen Transkriptase entstehen während der Vermehrung von HBV häufig Mutationen, ähnlich wie es für HIV- und andere RNA-Viren einschließlich HCV bekannt ist (für Review siehe Günther *et al.*, 1998). Deshalb sind Patienten immer mit einer sehr heterogenen Population von HBV und HCV infiziert. Die Heterogenität beeinflusst die Pathogenese, die Virusresistenz, das Ansprechen auf die Therapie mit Interferonen (IFN) und antiviralen Substanzen (Nukleosidanaloge und andere) sowie die Erkennung der infizierten

Zellen durch das Immunsystem. Diese Befunde belegen, dass neue antivirale Strategien für die Verhinderung einer *de novo*

HBV-Infektion und vor allem die Therapie einer chronischen Infektion notwendig und sinnvoll sind, trotz der Verfügbarkeit einer Vakzine und prophylaktisch verabreichbarer Antikörper.

5

## 2.2. Möglichkeiten der Therapie des Immunschutzes einer HBV-Infektion

Eine der wenigen Therapiemöglichkeiten einer chronischen HBV-Infektion ist die Behandlung mit Interferonen (IFN). Diese ist anerkannt, zugelassen, aber nur zumindest teilweise wirksam.

Bei Koinfektionen mit HIV und HCV, die relativ häufig vorkommen, ist die Erfolgsrate einer IFN-Behandlung noch geringer als bei alleiniger HBV- oder HCV-Infektion. Alle Reservoirs an HBV und HCV werden selbst bei klinisch erfolgreicher IFN-Behandlung so gut wie nie eliminiert und können zu einer Reaktivierung der Infektion führen (Rehermann *et al.*, 1996). Wesentlicher Nachteil einer anti-HBV-Therapie auf der Basis von IFN-Gabe ist, dass diese häufig mit negativen Nebenwirkungen assoziiert ist (für Review siehe Trautwein und Manns, 2001).

15

Die für HBV eingesetzten Nukleosidanaloga hemmen das Umschreiben der prägenomischen RNA in DNA durch die Virus-kodierte Polymerase. Ein großer Nachteil von Nukleosidanaloga (z.B. Lamivudine, Famcyclovir, Adefovir und Entecavir) ist, dass es so gut wie immer zur Selektion von Medikamenten-resistenten HBV-Stämmen kommt. Außerdem bergen Nukleosidanaloga die Gefahr, dass sie chromosomale Mutationen und daher Krebs auslösen können. Die im Rahmen der hier vorgestellten Erfindung genannten neuen Medikamente sind nicht mit diesem Risiko und den Nebenwirkungen behaftet.

20

## 2.3. Biologie und Behandlung von HCV-Infektionen

Auch die Infektion mit Hepatitis-C-Virus (HCV) ist eines der großen Weltgesundheitsprobleme. Mit diesem Virus sind ca. 170 Millionen Menschen (d.h. ca. 3%) der Weltbevölkerung infiziert. Manche Länder haben eine Durchseuchung mit HCV von über 10% der Bevölkerung. Im Gegensatz zu HBV gibt es bisher keine effektiven Impfstoffe für HCV. Die HCV-Infektion verläuft in ca. 80% der Fälle chronisch mit unterschiedlichem Schweregrad von Leberentzündungen. Ähnlich wie bei HBV ist auch die chronische HCV-Infektion mit einem sehr hohen Risiko der Entstehung von Leberzirrhose und Leberkarzinom verbunden. Für beide Erkrankungen gibt es kaum Heilungschancen außer einer erfolgreichen Lebertransplantation. HCV gehört zu den Flaviviren und kodiert ca. 10 Genprodukte. Die Infektion wird in der Regel durch Bestimmung der spezifischen anti-HCV-Antikörper, der viralen Antigene und RNA

30



diagnostiziert. Ähnlich wie bei HBV ist die Pathogenese, die sich durch unterschiedliche Grade der Leberentzündung bis hin zum Leberversagen, der Entstehung einer Leberzirrhose/Fibrose und eines Leberkarzinoms sowie Begleiterkrankungen auszeichnet. Auch die Therapie beruht ähnlich wie bei HBV vorwiegend auf der Behandlung mit Interferon alpha und Derivaten sowie mit Nukleosidanalogen und weiteren Substanzen unbekannter Wirkweise (für Review siehe Trautwein und Manns, 2001). Seit 1999 ist für die Therapie der chronischen HCV das Guanosinanalogen Ribavirin in Kombination mit Interferonen zugelassen. Die Wirkungsweise dieses Medikaments ist jedoch nur unvollständig geklärt. Eine vollständige Eliminierung von HCV ist bei der Gabe von Ribavirin nicht zu erwarten. Ribavirin hat außerdem häufig eine Reihe von Nebenwirkungen (für Review siehe Trautwein und Manns, 2001). Für alle gegenwärtig zugelassenen Medikamente für HBV und HCV sowie HDV (Hepatitis-D-Virus) gilt, dass es eine Vielzahl von Nonrespondern gibt, denen nur grundsätzlich neue Medikamente helfen können, wie sie in dieser Erfindung beschrieben werden.

#### 2.4. Verbindung zwischen dem UPS und dem Replikationszyklus von Hepadnaviren

Für eines der regulatorischen Proteine von HBV, das HBx Protein, wurde gezeigt, dass es mit einer Untereinheit des 26S Proteasom-Komplexes interagiert und dass diese Interaktion für die Funktion von HBx essentiell ist (Hu *et al.*, 1999). Weiterhin wurde berichtet, dass die Präsentation von HBV und HCV antigenen Determinanten in Form von MHC Klasse I Peptid-Komplexen auch in Gegenwart von Proteasom-Inhibitoren effizient erfolgen kann (López *et al.*, 2000). Die Erkennung von HBV-infizierten Leberzellen durch zytotoxische T<sub>CD8+</sub>-Zellen und damit die zelluläre natürliche Immunität gegen eine HBV-Infektion wäre somit durch eine Therapie mit Proteasom-Inhibitoren nicht beeinflusst, wie dies in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung vorgeschlagen wird.

##### 2.4.1. Funktion des UPS in der Replikation von HCV

Die Expression von HCV-Proteinen beeinflusst nicht wie bei HBV die Aktivität des UPS (Moradpour *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die MHC-Klasse I Antigenpräsentation und die Prozessierung von viralen Antigenen von HCV nicht beeinflusst werden und somit andere Immunescape-Mechanismen für die Etablierung einer persistenten HCV notwendig sind. Eine Fraktion des HCV core-Proteins selbst wird *via* UPS abgebaut, und eine mono-ubiquitinierte Form des core-Proteins wurde beobachtet (Suzuki *et al.*, 2001).

#### 2.4.2. Funktion des UPS in der Replikation von HCC

Bisher wurde nicht getestet, ob Proteasom-Inhibitoren einen Einfluss auf die Proliferation oder den Transformationstatus von hepatozellulären Karzinomen (HCC) haben. Lediglich bekannt ist, dass eine Proteasom-Untereinheit in den meisten HCCs überexprimiert wird (Higashitsuji *et al.*, 2000).

Anhand des bekannten Standes kann festgehalten werden, dass die überraschenderweise festgestellte anti-virale Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf späte Prozesse der Retrovirusreplikation, wie zum Beispiel die Gag-Prozessierung, die Assemblierung und das Budding von HIV-1 oder HIV-2 Virionen sowie für die Produktion von infektiösen Nachkommen-Viren bzw. für den gesamten Virusreplikationszyklus bisher nicht berichtet wurde. Ebenso liegen keine Berichte über die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Behandlung von Infektionen mit HIV oder anderen Retroviren vor. Weiterhin kann festgestellt werden, dass in keiner der bislang in der Fach- oder Patentliteratur publizierten Studien oder anderen bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt publizierten Arbeiten getestet oder berichtet wurde, dass Proteasom-Inhibitoren einen Einfluss auf die Freisetzung und die Infektiosität von Hepatitisviren ausüben, wie dies in der vorliegenden Erfindungsbeschreibung dargestellt wird. Insbesondere wurden keinerlei anti-virale Effekte durch Proteasom-Inhibitoren auf die Prozesse des HBV-Replikationszyklus ermittelt. Weiterhin wurde nicht berichtet, dass Proteasom-Inhibitoren bevorzugt durch Hepatitis-Infektionen hervorgerufene Leberkarzinomzellen abtöten und dadurch für die Therapie von Leberkarzinomen geeignet sind. Die erfindungsgemäß dargestellten Wirkungen von Proteasom-Inhibitoren auf frühe und späte Prozesse der HBV-Replikation wie auch auf die Entwicklung von sekundärer Leberzirrhose und Leberkarzinomen stellen somit völlig neuartige Prinzipien der anti-viralen Behandlung von HBV-Infektionen dar. Die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren in der anti-viralen Therapie von Hepatitis-Infektionen, speziell zur Verhinderung der Etablierung oder der Aufrechterhaltung einer akuten und chronischen HBV- und HCV-Infektion wurde bislang nicht berichtet.

Folgende Patentschriften, welche die vorliegende Erfindung nicht unmittelbar betreffen, wurden veröffentlicht: Eine Erfindung, welche Mittel zur Interferenz von HBV-Infektionen auf der Basis von HBV-Protein X Wechselwirkung mit Proteasom-Untereinheiten beschreibt (US 5872206); ein Verfahren zur Bestimmung der Proteasom-Aktivität in biologischen Proben (WO 00/23614); die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren als Mittel zur Behandlung von Krebs, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (WO 99/22729); die Verwendung von Inhibitoren

des UPS als Mittel zur Behandlung von Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (WO 99/15183).

## 5 Wesen der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel zur Verfügung zu stellen, die zur Behandlung von Virus-Infektionen geeignet sind und welche insbesondere

- die Freisetzung und Reifung von infektiösen Retroviren, vor allem von Immundefizienzviren, wie zum Beispiel HIV-1 und HIV-2, hemmen und

10 - zur Behandlung, Therapie und Hemmung einer Virushepatitis verwendet werden können.

Die Aufgabe wurde durch den Einsatz von mindestens einem Proteasom-Inhibitor gelöst. Es sind erfindungsgemäß Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen entwickelt worden, die als wirksame Komponenten Proteasom-Inhibitoren in pharmazeutischen Zubereitungen enthalten.

Die Erfindung bezieht sich auf Virus-Infektionen insbesondere solcher Viren, die im Rahmen  
15 des Replikationszyklus von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt, welche die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pathway hemmen, regulieren oder anderweitig beeinflussen.

Es ist auch möglich, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die speziell  
20 die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten 20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur beeinflussen. Diese Inhibitoren können entweder eine oder mehrere oder alle drei hauptsächlich proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms (die Trypsin-, die Chymotrypsin- und die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten) innerhalb des 26S- oder auch des  
25 20S-Proteasom-Komplexes hemmen.

Eine Variante der Erfindung besteht darin, als Proteasom-Inhibitoren Substanzen einzusetzen, die von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach Zellaufnahme mit der katalytischen beta-Untereinheit des 26S-Proteasoms in Wechselwirkung treten und dabei alle  
30 oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel blockieren.

Als eine weitere Form der Erfindung kommen Mittel zum Einsatz, welche die Aktivitäten der Ubiquitin-konjugierenden wie auch der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme hemmen. Dazu

gehören auch zellulären Faktoren, die mit Ubiquitin - als Mono- oder auch als Poly-Ubiquitin - in Wechselwirkung treten. Poly-Ubiquitinierung gilt allgemein als ein Erkennungssignal für die Proteolyse durch das 26S-Proteasom, und die Beeinflussung des Ubiquitin-Pathway kann ebenfalls die Aktivität des Proteasoms regulieren.

- 5 Erfindungsgemäß werden als Proteasom-Inhibitoren auch Substanzen eingesetzt, die in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan, in verkapselter Form mit oder ohne Zellspezifität-tragende Veränderungen, oder anderweitig verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität und/oder hohe Selektivität für bestimmte Zellen und Organe aufweisen, keine oder  
10 unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relativ hohe metabolische Halbwertszeit und eine relativ geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

Als Proteasom-Inhibitoren werden des weiteren Substanzen eingesetzt, die in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden, durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen oder total-synthetisch hergestellt werden oder durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert oder durch gentechnische Verfahren *in vitro* oder in Mikroorganismen hergestellt werden. Dazu gehören:

- a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Epoxomicin (Epoxomycin) und Eponemycin,
- Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin),
- 20 - Lactacystin und dessen chemisch modifizierte Varianten, insbesondere die Zellmembranpenetrierende Variante "Clastolactacystein  $\beta$ -Lacton",

- b) synthetisch hergestellte :

- modifizierte Peptidaldehyde wie zum Beispiel N-carbobenzoxymethyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-carbobenzoxymethyl-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115); N-Acetyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Norleucinal (bezeichnet als LLnL); N-carbobenzoxymethyl-Ile-Glu(OBu)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);
- Peptide, die C-terminal  $\alpha,\beta$ -Epoxyketone (auch bezeichnet als Epoxomicin / Epoxomycin oder Eponemycin), Vinyl-sulphone (zum Beispiel Carbobenzoxymethyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-vinyl-sulfon oder 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylacetate-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucyl-vinyl-sulfon, auch bezeichnet als NLVS), Glyoxal oder Borsäure-Reste (zum Beispiel Pyrazyl-CONH(CHPh)CONH(CHisobutyl)B(OH)<sub>2</sub>), auch bezeichnet als "PS-431" oder Benzoyl(Bz)-Phe-boroLeu, Phenacetyl-Leu-Leu-boroLeu, Cbz-Phe-boroLeu); Pinacol-Ester - zum Beispiel Benzyloxycarbonyl (Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester - tragen;

und

- als besonders geeignete Verbindungen werden Peptide und Peptid-Derivate eingesetzt, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen tragen, hierzu zählen beispielsweise Epoxomicin (Molekülformel:  $C_{28}H_{86}N_4O_7$ ) und Eponemycin (Molekülformel:  $C_{20}H_{36}N_2O_5$ );

5 - chemisch modifizierte Derivate auf der Basis von natürlich vorkommenden, insbesondere ein  $\beta$ -Lacton-Derivat mit der Bezeichnung PS-519 (1R-[1S, 4R, 5S]]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione, Molekülformel:  $C_{12}H_{19}NO_4$ ), welches sich von dem natürlichen Proteasom-Inhibitor Lactacystin ableitet;

- bestimmte Dipeptidyl-Borsäure-Derivate, insbesondere Verbindungen, welche sich von dem  
10 Pyranozyl-Phenyl-Leuzinyl-Borsäure-Derivat mit dem Namen "PS-341" (N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-leuzin-Borsäure, Molekülformel:  $C_{19}H_{25}BN_4O_4$ )

ableiten. Hierzu zählen weiterhin die Verbindungen "PS-273" (Morpholin-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) und dessen Enantiomer PS-293, die Verbindung PS-296 (8-Quinoly-sulfonyl-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>); die

15 Verbindung PS-303 (NH<sub>2</sub>(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>); die Verbindung PS-321 (Morpholin-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)<sub>2</sub>); die Verbindung PS-334 (CH<sub>3</sub>-NH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>); die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-homo-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>); die Verbindung PS-352 (Phenylalanin-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>); die  
20 Verbindung PS-383 (Pyridyl-CONH-(CHpF-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>). Alle diese Verbindungen wurden bereits beschrieben, unter anderem in Adams *et al.* (1999).

Als besonders geeignete Verbindungen haben sich, neben Epoxomicin und Eponemycin, die Proteasom-Inhibitoren PS-519, PS-341 und PS-273 (entwickelt von der Firma Millennium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA 02139, USA) erwiesen. Diese Proteasom-Inhibitoren sind

25 sehr potent, sehr spezifisch für das Proteasom, blockieren keine anderen zellulären Proteasen und haben daher so gut wie keine Nebenwirkungen. Die Proteasom-Inhibitoren PS-341 und PS-519 wurden außerdem sowohl in Tiermodellen für vorklinische als auch in Menschen (Krebspatienten) für klinische Studien getestet.

Mit den Proteasom-Inhibitoren werden erfindungsgemäß Mittel zur Verfügung gestellt, die  
30 überraschenderweise

- durch die Blockierung von späten Prozessen der Retrovirus-Replikation die Produktion von infektiösen Nachkommen-Viren beeinträchtigen und damit die Ausbreitung der Infektion im Organismus verhindern;

- die Freisetzung von infektiösen Hepatitisviren, insbesondere von HBV und HCV, aus infizierten Zellen blockieren;
- die Ausbreitung einer akuten Infektion mit Hepatitisviren begrenzen;
- das bevorzugte Absterben von Leberkarzinomzellen bewirken;
- 5 - die Virämie sowohl bei einer Neuinfektion als auch bei chronischen Infektionen mit Hepatitisviren unterdrücken und den Erfolg einer Viruseliminierung durch das eigene Immunsystem und/oder durch bekannte Mittel mit ähnlicher oder anderer Wirkung erhöhen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird überraschenderweise festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren späte Prozesse im Replikationszyklus von Retroviren hemmen. Dabei wurde  
10 spezifisch festgestellt, dass sich die erfindungsgemäße Verwendung von Proteasom-Inhibitoren dazu eignet, die Assemblierung und Freisetzung von Virionen von der Zelloberfläche zu hemmen. Dabei tritt eine Hemmung der proteolytischen Prozessierung der Gag-Strukturproteine durch die virale Protease ein. Ebenfalls ist die Infektiosität der freigesetzten Virionen reduziert.

- 15 Die Hemmung folgender Retroviren ist möglich: Spumaviren, Mammalian C-Typ Oncoviren, BLV (Bovine Leukemia Virus), HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus), Leukämieviren, RSV (Rous Sarcoma Virus) Viren oder Lentiviren. Als Beispiele für Leukämieviren kommen BLV, HTLV-I oder HTLV-II in Frage, Beispiele für Lentiviren sind Humanes Immundefizienzvirus Type 1 (HIV-1), Humanes Immundefizienzvirus Type 2 (HIV-2), Affen-Immundefizienzvirus  
20 (SIV), Katzen-Immundefizienzvirus (FIV) oder Rinder-Immundefizienzvirus (BIV).

Gegenstand der Erfindung ist - ebenfalls unter Verwendung von Proteasom-Inhibitoren - die Bekämpfung/Behandlung von Erkrankungen/pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit Retroviren verursacht wurden. Die Erkrankungen/pathologischen Erscheinungen können durch Infektionen mit Leukämieviren, humanen T-Zell Leukämieviren HTLV-I und  
25 HTLV-II oder durch Infektionen mit Lentiviren verursacht werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Bekämpfung/Behandlung von AIDS mittels Proteasom-Inhibitoren, sowohl in der frühen symptomlosen als auch in der fortgeschrittenen Krankheitsphase. Sie, die Proteasom-Inhibitoren, können auch in Kombination mit anderen anti-retroviralen Medikamenten eingesetzt werden, z.B. mit Blockern von viraler  
30 RT und PR. Auch die Kombination mit anti-retroviralen Therapien basierend auf gentherapeutischen Interventionen ist möglich. Eine weitere Verwendung ergibt sich durch die Kombination mit intrazellulärer Immunisierung, wie z.B. dem Einbringen von anti-HIV-1/HIV-2 wirksamen Genen in Stammzellen und/oder in periphere CD4<sup>+</sup> Lymphozyten.

Eine Verhinderung des Krankheitsausbruches und eine Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von Viruslast) von symptomlosen HIV-1/HIV-2 seropositiven und HIV-1/HIV-2-infizierten Personen ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich. Weiterhin können Proteasom-Inhibitoren zur Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von HIV-induzierter

5 Demenz, insbesondere zur Verhinderung der HIV-Infektion von Neuronen, Glia und Endothelzellen in Kapillaren des Gehirns eingesetzt werden. Eine weitere Verwendung ist die Verhinderung der Etablierung einer systemischen HIV-1/HIV-2-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus (zum Beispiel bei Nadel-Stich-Verletzungen mit HIV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten).

10 Die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren in der Grundlagenforschung zum Verständnis der Retrovirusassemblierung, der Wirkungsweise der viralen Proteasen, bei Studien der Gag-Prozessierung, bei der Entwicklung von weiteren Substanzen, welche die Gag-Prozessierung beeinflussen, bei Untersuchungen zum Verständnis zellulärer Mechanismen involviert in späte Prozesse der Retrovirus-Assemblierung kann ebenfalls erreicht werden.

15 Die Prinzip-Lösung der Aufgabe wird am Beispiel von HIV-1 und HIV-2 gezeigt. Es wird dargestellt, dass unmittelbar nach Zugabe von verschiedenen Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen Viruspartikeln gehemmt wird. Erfindungsgemäß wird dieses Phänomen sowohl in HIV-1 infizierten permanenten Kulturen von CD4<sup>+</sup> humanen T-

20 Zellen als auch in Kulturen von humanen Fibroblasten (HeLa-Zellen) transfiziert mit infektiöser proviraler DNA HIV-1 und HIV-2 beobachtet und hier näher beschrieben. Aufgrund dieser neuartigen Aktivitäten von Proteasom-Inhibitoren ist davon auszugehen, dass die Applikation von *in vivo* verträglichen Proteasom-Inhibitoren die Infektionsausbreitung von HIV im Organismus unterdrücken oder vollständig eliminieren kann.

25 Erfindungsgemäß wird gezeigt, dass der hemmende Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die HIV-Replikation folgende Mechanismen beinhaltet:

- 1) Blockierung/Reduktion der proteolytischen Prozessierung der Gag-Polypeptide durch die HIV-1 PR (Protease);
- 2) Blockierung/Reduktion der Freisetzung und des Budding von neuen Virionen an der
- 30 Zellmembran;
- 3) Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen;
- 4) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung von HIV-1 in Kultur CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Diese Mechanismen können direkt oder indirekt mit dem Phänomen in Zusammenhang stehen, dass Ubiquitin-Ligasen mit L (late assembly)-Domänen von HIV-1 Gag-Proteinen in

Wechselwirkung treten (Strack et al., 2000, Kategorie XXX) und dass nach Inaktivierung des UPS die Mono-Ubiquitinierung von L-Domänen enthaltenden HIV-1 Gag-Proteinen blockiert wird (Schubert et al., 2000 und Ott et al, 2000, Kategorie XXX).

Zur Lösung der Aufgabe wurden im Rahmen der Erfindung verschiedene proteinchemische, molekular-virologische und morphologische Studien an HIV-1 durchgeführt. Erfindungsgemäß wird der durch Proteasom-Inhibitoren ausgelöste Defekt in der Gag-Prozessierung mittels biochemischer Methoden dargestellt. Dazu wurde eine metabolische pulse-Markierung von HIV-Proteinen mittels radioaktiver Aminosäuren, gefolgt von einer Inkubation (chase) in nicht-radioaktivem Medium, durchgeführt. Die dabei gewonnenen Informationen ermöglichen die Darstellung des hemmenden Effektes von Proteasom-Inhibitoren auf Gag-Prozessierung und Budding von HIV-*Virionen* innerhalb kurzer Zeit-Kinetiken, die Teilabschnitten eines HIV-Replikationszyklus entsprechen.

Erfindungsgemäß wird dargestellt, dass die hemmende Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf HIV-Assemblierung und Freisetzung nicht die enzymatische Aktivität der HIV-1 PR trifft. Durch *in vitro* Prozessierungsstudien an isolierten Gag- und PR-Molekülen von HIV-1 wird gezeigt, dass verschiedene Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren keinerlei Einfluss auf die enzymatische PR-Aktivität ausüben.

Ferner wird erfindungsgemäß die durch Wirkung der Proteasom-Inhibitoren reduzierte Infektiosität freigesetzter unreifer HIV-*Virionen* mittels End-Punkt-Titrationsstudien in CD4<sup>+</sup> T-Zellkulturen dargestellt. Dabei wird gezeigt, dass allein eine Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren für sechs Stunden (entspricht etwa einem Drittel eines HIV-Replikationszyklus in der Targetzelle) zu einer 10-fachen Reduktion im Virus-Titer und zu einer 50-fachen Reduktion der spezifischen Infektiosität des freigesetzten Viruspartikels führt.

Erfindungsgemäß wird der Einfluss von Proteasom-Inhibitoren auf die Morphologie von HIV-1 *Virionen* im Assemblierungs- und Budding-Prozess an der Zellmembran untersucht. Zur Lösung dieser Aufgabe wird hochauflösende Transmissions-Elektronenmikroskopie an HIV-1-infizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Dabei wird festgestellt, dass die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren für einen Zeitraum von etwa 5 Stunden zu folgenden Veränderungen in der Virusmorphologie führt:

- 1) Der Arrest von assemblierenden *Virionen* in der Budding-Phase ist signifikant erhöht;
- 2) die Ablösung der *Virionen* von der Zelloberfläche ist gestört, und es kommt zur Ausbildung von Virus-Membran-Verbindungen ("Stalk-formation");



3) die absoluten Zahl von Viruspartikeln an der Zelloberfläche ist reduziert;

4) die relative Zahl von unreifen, zellfreien Virionen ist erhöht.

Erfindungsgemäß wird der inhibitorische Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Virusreplikation in Kulturen HIV-1-infizierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen demonstriert. Die Zugabe von nanoM Konzentrationen an verschiedenen Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren verhindert die Infektionsausbreitung und bewirkt das Ausbleiben einer produktiven Virusreplikation.

Das in der Erfindungsbeschreibung dargestellte Prinzip der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung einer HIV-Infektion ist neuartig in Hinsicht auf die Verwendung einer bereits bekannten Substanzklasse (den Proteasom-Inhibitoren) für eine neue Aktivität (der Blockierung von Gag-Prozessierung und Freisetzung von Retroviren).

Gleichzeitig ist die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren auch neuartig hinsichtlich des Anwendungsprinzips. Bislang sind keine Substanzen / Prinzipien / Methoden bekannt, welche späte Prozesse der HIV-Replikation beeinflussen, ohne dabei Mutationen im Virus selbst als Voraussetzung zu haben.

Weiterhin ist neu, dass die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung von HIV und anderen Retroviren nicht das Virus selbst, sondern Mechanismen trifft, die in allen Wirtszellen des Virus konserviert sind. Im Vergleich zu bisherigen anti-retroviralen Methoden, die essentielle Komponenten des Virus per se betreffen, ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Resistenzmechanismen bei Applikation von Proteasom-Inhibitoren in der anti-retroviralen Therapie um Größenordnungen geringer. Die Neuartigkeit dieses Wirkprinzips von Proteasom-Inhibitoren zeigt sich auch in der Tatsache, dass Proteasom-Inhibitoren ein breites Wirkungsspektrum gegenüber unterschiedlichen Isolaten von HIV-1 und HIV-2 besitzen. Der inhibitorische Effekt wurde im Rahmen der Erfindung mit gleicher Intensität bei verschiedenen primären wie auch Zellkultur-adaptierten T-Zelltropen und Makrophagen-tropen HIV-Isolaten beobachtet.

Neuartig ist weiterhin das Prinzip der Wirkung von Proteasom-Inhibitoren, die zwar nicht den Viruseintritt, wohl aber die Produktion von infektiösen Viruspartikeln von bereits infizierten Zellen verhindern. Dadurch sollte wesentlich die Menge an infektiösen Virionen (Viruslast) und somit die Infektionsausbreitung *in vivo* reduziert werden können. Die mittlere Überlebenszeit einer akut HIV-infizierten T-Zelle beträgt wenige Tage. Zudem ist bekannt, dass die Hemmung der Virusfreisetzung und die damit verbundene Akkumulation von zum Teil toxischen HIV-Proteinen (insbesondere den Env-Hüllproteinen) zu einem verstärkten zytopathischen Effekt und dadurch zum schnelleren Absterben der infizierten Zelle führt. Neben der Neuinfektion sollte die

Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auch zu einem schnelleren Absterben von bereits infizierten Zellen führen.

In der Summe dieser neuartigen Mechanismen lässt sich feststellen, dass die verminderte Freisetzung von noch dazu wenigen oder gar nicht infektiösen Viruspartikeln im Netto-Effekt bei gleichzeitigem Zelltod der Virus-produzierenden Zellen im Falle einer *in vivo* Anwendung von Proteasom-Inhibitoren die Menge an infektiösen Virionen im peripheren Blut und gleichzeitig die Zahl infizierter Produzentenzellen von HIV im Gesamt-Organismus reduziert wird. Dies macht die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren allein oder in Kombination mit bereits in der anti-retroviralen Therapie verwendeten Enzymhemmern attraktiv.

#### Proteasom-Inhibitoren reduzieren die Infektiosität von HIV-1 Viruspartikeln

Im Rahmen der Erfindung wird erstmalig gezeigt, dass unmittelbar nach Inaktivierung des Proteasom-Pathway durch Behandlung von HIV-1 infizierten T-Zellen die Freisetzung von Viruspartikeln reduziert wird. Des weiteren wird die spezifische Infektiosität der freigesetzten Virionen erniedrigt und dadurch der spezifische Titer an neuproduzierten Viruspartikeln dramatisch reduziert (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 1).

Erfindungsgemäß werden hierzu  $CD4^+$  T-Zellen mit HIV-1 infiziert und zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 80% der Zellkultur befindet sich in der akuten Infektionsphase) mit Proteasom-Inhibitoren für verschiedene Zeiträume, bis maximal 4.5 Stunden behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Behandlung werden virushaltige Zellkulturüberstände geerntet. Die Menge an freigesetzten Virionen wird mittels anti-Capsid Antigen-ELISA bestimmt, und die spezifische Infektiosität der neu produzierten Virionen wird mittels Endpunkt-Titration ermittelt.

Erfindungsgemäß wird mit diesem Ergebnis eine neuartige Aktivität von Proteasom-Inhibitoren festgestellt. Diese kann nicht auf eine rein unspezifische Beeinträchtigung des Zellmetabolismus durch Abschaltung des UPS zurückgeführt werden, und zwar aus folgenden Gründen:

- Dieser Effekt wird sehr frühzeitig wirksam, zu einem Zeitpunkt, zu dem potentielle negative Effekte der Proteasom-Inhibition auf Zellprozesse wie zum Beispiel Proteinsynthese und -faltung sowie die Funktionen von Chaperonen noch nicht wirksam werden können.
- Die freigesetzten Virionen haben eine deutlich reduzierte Infektiosität, was im Rahmen der weiteren Erfindungsbeschreibung mit einem spezifisch durch Proteasom-Inhibitoren ausgelösten Defekt in der proteolytischen Reifung von HIV-Partikeln erklärt wird.

- Toxische Effekte wie unspezifische Zelllyse, Apoptose oder die unspezifische Freisetzung von zellulären und viralen Proteinen wurden unter den hier beschriebenen experimentellen Bedingungen der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren nicht festgestellt.

- Die hemmende Wirkung von Proteasom-Inhibitoren ist ausschließlich auf die Beeinflussung zellulärer Prozesse zurückzuführen, die für die Virusassemblierung, Freisetzung und die Virus-Reifung notwendig sind, nicht aber auf chemische Veränderungen der freigesetzten Virionen selbst. Diese Tatsache reflektiert die erfindungsgemäß gemachte Beobachtung, dass zellfreie HIV-1 Virionen, die in Zellen mit aktivem Proteasom-Pathway produziert werden, nicht in ihrer Infektiosität beeinträchtigt wurden, wenn man diese mit relativ hohen Konzentrationen an Proteasom-Inhibitoren vor der Titration behandelt.

Zusammengefasst kann hiermit festgestellt werden, dass Proteasom-Inhibitoren durch die Beeinflussung zellulärer Prozesse die Produktion von infektiösen HIV-1 Partikeln stört. Der Mechanismus dieses Effektes wird im folgenden näher erläutert.

#### Elektronenmikroskopische Analyse von HIV-1 infizierten Zellen

- Im Rahmen der Erfindung wird die spezifische Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf Assemblierung und Budding von HIV-1 Virionen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie untersucht (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 2). Erfindungsgemäß wird mit dieser Methode die neuartige Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Virusmorphologie deutlich gemacht. Hierzu werden akut infizierte T-Zellen mit Proteasom-Inhibitoren für 5 Stunden behandelt. Die Zellen werden in Zellulose-Kapillaren eingeschlossen, inkubiert, fixiert und für Dünnschnitte verwendet. Diese Methode hat den wesentlichen Vorteil, dass Virionen in den Zellulose-Kapillaren zurückgehalten werden und daher keine Konzentrierung und damit Veränderung der Virusmorphologie durch Zentrifugation notwendig ist.

Erfindungsgemäß werden bei dieser Untersuchung wesentliche Phänomene der Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Virusmorphologie beobachtet:

- Eine relative Reduktion in der Zahl von extrazellulären Viruspartikeln und Buddingstrukturen an der Zellmembran;
- eine relative Zunahme in der Zahl von unreifen Viruspartikeln, die mit der Zellmembran verhaftet bleiben und sich nicht vollständig abschnüren können.

Diese elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigen die im Rahmen der Erfindung gemachten biochemischen und virologischen Beobachtungen, dass die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung und die Infektiosität neuer Virionen reduziert.

Gleichzeitig zeigen diese elektronenmikroskopischen Untersuchungen an, dass die proteolytische Reifung und damit die Reifung von Viruspartikeln durch die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren negativ beeinflusst werden. Wesentlicher Prozess der HIV-Reifung ist die proteolytische Spaltung der Gag-Polypoteine durch die virale Protease. Im Rahmen der weiteren Untersuchungen wird gezeigt, dass eben dieser Prozess der proteolytischen Reifung durch Proteasom-Inhibitoren gehemmt wird.

#### Proteasom-Inhibitoren reduzieren die Kinetik von Gag-Prozessierung und Virusbudding von HIV-1 und HIV-2

Im Rahmen der Erfindung wird mittels pulse/chase-Analysen nachgewiesen, dass Proteasom-Inhibitoren die Kinetik von Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung / Budding wesentlich reduzieren (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 3). Erfindungsgemäß werden hierzu Zellen (entweder T-Zellen infiziert mit HIV-1 oder HeLa-Zellen transfiziert mit infektiöser proviraler DNA von HIV-1 oder HIV-2) zum Zeitpunkt der maximalen Expression der viralen Proteine mit [<sup>35</sup>S]-Methionin in der Zelle metabolisch für einen relativ kurzen pulse-Zeitraum von ca. 30 min markiert. Anschließend werden die Zellen in Abwesenheit von radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des chase-Zeitraums werden äquivalente Proben von Zellen, dem Medium und der durch Zentrifugation isolierten Virionen gewonnen. Der Transport, die Prozessierung und die Assemblierung der radioaktiv markierten viralen Proteine werden insgesamt über einen chase-Zeitraum von 8 Stunden verfolgt. Die einzelnen HIV-Proteine werden durch Immunpräzipitation mittels HIV-spezifischer Antikörper und AIDS-Patientenserum aus dem intrazellulären, dem extrazellulären und den Virus-assoziierten Fraktionen isoliert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Image-Analyse quantifiziert. In parallelen Ansätzen eines jeweiligen Experimentes werden Zellen mit Proteasom-Inhibitoren behandelt, während im Kontroll-Ansatz die Zellen unbehandelt bleiben. Um eine möglichst vollständige Blockierung der Proteasom-Aktivität zu erzielen, werden die Zellen mit jeweils 25 microM zLLL und LC behandelt. Die Inhibitoren werden ca. 30 min vor Beginn der pulse-Markierung zu dem Zellkulturmedium gegeben. Diese kurze Vorinkubation beeinträchtigt nicht die Protein-Biosynthese und bewirkt auch keine wesentlichen Veränderungen in der Konzentration an zellulären Chaperonen (Schubert *et al.*, 2000, Kategorie XXX). Die relative Menge an markiertem Gag-Polyprotein Pr55 und dem Hauptprozessierungsprodukt p24 Capsid (CA) wird für jeden Zeitpunkt der Probenentnahme in den Zell-, Medium-, und Virus-Fractionen ermittelt. Davon ausgehend wird die Rate der Virusfreisetzung (entspricht der Menge an radioaktiv markiertem Gag, welches innerhalb von 8

Stunden nach Synthese in der Virus-Fraktion auftritt) und Gag-Prozessierung (Rate der Umwandlung von radioaktiv markierten Gag Pr55 in CA) ermittelt.

Im Rahmen der Erfindung wird dabei eine ca. 6-fache Reduktion in der Virusfreisetzungskinetik innerhalb der ersten zwei Stunden nach pulse-Markierung in Zellen mit inaktivierten Proteasomen beobachtet (Fig. 2). Parallel dazu wird ebenfalls eine ähnlich starke Reduktion in der Kinetik der Gag-Prozessierung beobachtet, die als der Quotient von CA zu Pr55 für jeden Zeitpunkt des chases ermittelt wurde (Fig. 2). Dieser Prozessierungseffekt scheint mehrere Schritte der Reifung von Pr55 zu beeinflussen. Die vollständige Spaltung von HIV-1 Pr55 resultiert allgemein in der Entstehung der reifen Gag-Proteine MA, CA, NC und P6<sup>gag</sup> sowie zwei kleinerer Spacer-Peptide, welche die einzelnen Domänen miteinander verbinden. Mehrere dieser Spaltprozesse scheinen im Prozess der Gag-Prozessierung durch die Einwirkung von Proteasom-Inhibitoren gehemmt zu sein, da das Auftreten von Intermediaten der Gag-Prozessierung wie zum Beispiel MA-CA (p41), p39 (CA-NC) oder CA mit einem 14 Aminosäure langen Spacer (p25<sup>CA</sup>) nach Blockade der Proteasom-Aktivität beobachtet werden. Im Unterschied zur Gag-Prozessierung beeinflussen die Proteasom-Inhibitoren nicht die Prozessierung der Env-Hüllproteine, auch wird nicht die Expression und die Stabilität anderer viraler Proteine beeinträchtigt.

Zusammengefasst wird festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren die Gag-Prozessierung und die Freisetzung von Viruspartikel blockieren. Das Ausmaß der Hemmung ist abhängig von der Zeit der Vorinkubation mit Proteasom-Inhibitoren vor dem Start des pulse/chase-Experimentes. Nach ca. 5 Stunden Vorinkubation ist die Prozessierung von Gag-Proteinen und die Freisetzung von Viruspartikeln fast vollständig blockiert.

Dieser neuartige Effekt von Proteasom-Inhibitoren scheint einen generellen Mechanismus der Assemblierung, des Budding und der Reifung von Retroviren zu beeinflussen. Dieser Effekt ist nicht spezifisch auf ein bestimmtes HIV-1-Isolat beschränkt. Vergleichende Analysen von Makrophagen-tropen HIV-1-Isolaten zeigen ähnliche Effekte, wie sie für T-Zell-trope HIV-1-Isolate beobachtet werden. Im Sinne der Erfindung wird ein hemmender Effekt von Proteasom-Inhibitoren auch auf die Gag-Prozessierung und die Virusfreisetzung von verschiedenen HIV-2-Isolaten beobachtet (Fig. 2, Panel HIV-2 in HeLa).

Es wird weiterhin gezeigt, dass die im Rahmen der Erfindung beschriebenen Phänomene einer spezifischen Inhibierung des 26S Proteasom-Komplexes bedürfen. Die Testung von Peptidaldhyden, welche ähnlich zLLL zytosolische Kaspasen, aber nicht das Proteasom inhibieren, üben keine hemmende Wirkung auf HIV-1 Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung aus.

Aufgrund der neuartigen Aktivität von Proteasom-Inhibitoren kann somit festgestellt werden, dass

- Proteasom-Inhibitoren sowohl die Prozessierung von Gag-Proteinen als auch die Freisetzung und das Budding von neuen Virionen von der Zelloberfläche blockieren;
- 5 - diese hemmende Eigenschaft von Proteasom-Inhibitoren ist nicht auf einzelne Isolate von HIV-1 beschränkt, sondern gilt auch für andere Lentiviren, wie zum Beispiel HIV-2;
- diese neuartige Aktivität basiert nicht primär auf unspezifisch wirkenden negativen Effekten von Proteasom-Inhibitoren auf zelluläre und virale Prozesse, da dieser Effekt selektiv für Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung im Prozess der Virusassemblierung und Reifung wirksam
- 10 wird;
- dieses Phänomen der selektiven Inhibierung der Aktivität des 26S Proteasom-Komplexes bedarf.

Da die Gag-Prozessierung zusammen mit einer effizienten Freisetzung von Viruspartikeln wesentlicher Bestandteil des Retrovirusreplikationszyklus und damit essentiell für die

15 Produktion von infektiösen Virionen ist, kann davon ausgegangen werden, dass die hier beschriebene neuartige Funktion von Proteasom-Inhibitoren geeignet ist, die Infektionsausbreitung von HIV-1 und HIV-2 (den zwei Erregern der AIDS-Pandemie) *in vivo* zu unterdrücken. Da HIV-infizierte Zellen allgemein nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen und zudem durch Blockierung der Virusfreisetzung der Zelltod infizierter Zellen noch beschleunigt

20 wird, kann diese neuartige Aktivität von Proteasom-Inhibitoren bei *in vivo* Applikation sowohl die Neuinfektion nicht-infizierter Zellen verhindern, als auch das Absterben bereits infizierter Zellen induzieren und somit eine vollständige Eradikation (Auslöschung) der Infektion bewirken. Auch ist für HIV-1 bekannt, dass eine effiziente Gag-Prozessierung Voraussetzung für eine effiziente Virusfreisetzung ist. Die beiden neuartigen Effekte von Proteasom-Inhibitoren auf

25 späte Prozesse der Virusreplikation sind somit direkt miteinander verbunden und können sich dadurch gegenseitig verstärken, jedoch nicht gegenseitig ausschließen.

#### Proteasom-Inhibitoren beeinflussen nicht die enzymatische Aktivität der HIV-1 Protease

Zum mechanistischen Verständnis der im Rahmen der Erfindung gezeigten neuartigen Effekte ist

30 es wesentlich, die spezifische Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die virale Protease von HIV näher zu verstehen. Die einfachste Erklärung für die in dieser Erfindung beschriebenen neuartigen Phänomene wäre eine direkte Hemmung der HIV-Protease durch Proteasom-Inhibitoren. Dieser Zusammenhang erscheint jedoch unwahrscheinlich, da beide Protease-Komplexe vollkommen verschiedene enzymatische Mechanismen ausüben: Während die HIV-1

Protease als Dimer wirksam wird und dabei den Mechanismus von Aspartat-Proteasen ausübt, stellt das Proteasom ein multi-Enzym-Komplex mit mehreren aktiven Zentren dar. Ungeachtet der Tatsache, dass die proteolytischen Aktivitäten und die katalytischen Mechanismen von HIV-Proteasen und dem Proteasom-Komplex grundsätzlich verschieden sind, erscheint eine Beeinflussung der viralen Protease durch Proteasom-Inhibitoren zumindest theoretisch möglich, da in der Literatur berichtet wurde, dass der HIV-1 spezifische Protease-Hemmer Ritonavir die Chymotrypsin-Aktivität des 20S Proteasoms inhibiert (André *et al.*, 1998; Schmidtke *et al.*, 1999).

Im Rahmen der Erfindung wird daher ein möglicher Einfluss von Proteasom-Inhibitoren auf die enzymatische Aktivität der HIV-1 Protease durch Studien der *in vitro* Prozessierung von Gag-Polypeptid untersucht (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 4). Erfindungsgemäß wird dazu rekombinantes Pr55 in Insektenzellen exprimiert und aus freigesetzten Virus-ähnlichen Partikeln gereinigt. Enzymatisch aktive HIV-1 Protease wird in *E. coli* exprimiert und durch Chromatographie gereinigt. Die spezifische Aktivität der Protease wird mittels Titration der aktiven Zentren ermittelt. Pr55 und Protease werden in ein Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:25 versetzt und für eine definierte Zeit unter Bedingungen inkubiert, bei denen nur ca. 50% des Substrates Pr55 proteolytisch prozessiert werden. Diese Reaktionsbedingungen erlauben den sensitiven Nachweis von geringfügigen Effekten auf die Enzymaktivität der Protease. Selbst unter diesen sensitiven Reaktionsbedingungen und unter sehr hohen Inhibitorkonzentration von bis zu 100 µM wird keinerlei inhibitorische Wirkung von beiden Proteasom-Inhibitoren, LC und zLLL, auf die Gag-Prozessierung festgestellt (Figur 3).

Zusammengefasst zeigen die im Rahmen der Erfindung gemachten Ergebnisse, dass Proteasom-Inhibitoren die enzymatische Aktivität der HIV-Protease nicht beeinflussen und daher die virale Protease nicht das direkte Target der Inhibitoren sein kann. Die Untersuchung des zugrunde liegenden Mechanismus erlaubt die Schlussfolgerung, dass zelluläre Prozesse das Target der negativen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren sind, welche für Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung von HIV essentiell sind. Aufgrund der im Rahmen der Erfindung erstmals beschriebenen neuartigen Beobachtung kann somit festgestellt werden, dass im Unterschied zu bereits angewendeten anti-retroviralen Therapien (Hemmer der viralen Enzyme Protease und Reverse Transkriptase) kein viraler Faktor das direkte Target dieser neuartigen Wirkung ist. Aufgrund der Tatsache, dass ein zellulärer Mechanismus das Target der Inhibitoren darstellt, wäre bei einer *in vivo* Applikation von Proteasom-Inhibitoren zur Unterdrückung der HIV-Replikation in HIV-Infizierten die Gefahr der Resistenzentwicklung von HIV gegenüber Proteasom-Inhibitoren vergleichsweise gering oder überhaupt nicht gegeben.

Proteasom-Inhibitoren hemmen die HIV-1 Virusreplikation in Zellkultur

Nachdem erfindungsgemäß gezeigt werden konnte, dass Proteasom-Inhibitoren späte Prozesse der Virusfreisetzung und Gag-Prozessierung im Retrovirus-Replikationszyklus hemmen, war es wichtig, diesen negativen Effekt auch für die Infektionsausbreitung und damit den vollständigen Replikationszyklus von HIV zu demonstrieren. Aufgrund der im Rahmen der Erfindung beobachteten Phänomene, dass Proteasom-Inaktivierung eine verminderte Freisetzung von Virionen mit einer verminderten Infektiosität bewirkt, ist anzunehmen, dass die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren ebenfalls in einer verminderten Infektionsausbreitung in einer HIV-infizierten Kultur resultiert.

Erfindungsgemäß werden dazu parallele Kulturen einer CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie (zum Beispiel A3.01) mit einer definierten infektiösen Dosis von HIV-1 infiziert. Die Zellen werden nach Infektion in Medium mit dem oder ohne den Proteasom-Inhibitor zLLL in einer mittleren Konzentration von 5 microM über den gesamten Zeitraum der ca. 2 Wochen andauernden Kultur behandelt (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 5). Die Produktion neuer Virionen wird durch Messung der Akkumulation von Virus-assoziiierter Reverser Transkriptase Aktivität im Zellkulturüberstand ermittelt.

Erfindungsgemäß wird dabei festgestellt, dass in Gegenwart von zLLL entweder gar keine (Fig. 4, Panel 1. Experiment in A3.01) oder nur eine sehr verminderte (Fig. 4, Panel 2. Experiment in A3.01) produktive Infektion in der Kultur etabliert werden kann. Der Abbruch der RT-Akkumulation nach ca. einer Woche Inkubation in Kulturen mit aktiver Virusreplikation ist auf die allgemein bekannte Tatsache zurückzuführen, dass mit dem Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation die Zahl der Synzitia-Formierungen zunimmt, dadurch der HIV-induzierte Zelltod stärker ist als die Rate der Zellteilung und in Folge dessen die Gesamtkultur zum Stillstand kommt.

Um die Wirksamkeit unterschiedlicher Konzentrationen von verschiedenen Proteasom-Inhibitoren hinsichtlich Blockade der Virusreplikation zu untersuchen, werden erfindungsgemäß parallele Kulturen von infizierten Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an zLLL (Fig. 4, Panel 3. Experiment in A3.01) und Epoxomicin (Fig. 4, Panel 4. Experiment in A3.01) behandelt. Dabei zeigt sich ein Dosis-abhängiger Effekt auf die HIV-1 Replikation: Während 100 nanoM zLLL einen relativ schwach hemmenden Effekt ausübt, bewirkt 1 microM zLLL die vollständige Hemmung der Replikation, so wie zuvor bereits für 5 microM zLLL beobachtet. Im



Vergleich zu zLLL ist der sehr spezifische Proteasom-Inhibitor Epoxomicin sehr viel potenter in seiner Wirkung auf die Proteasom-Aktivität. Dies widerspiegelt sich in der erfindungsgemäß erhaltenen Beobachtung, dass 100 nanoM Epoxomicin eine vollständige sowie 10 nanoM Epoxomicin eine fast vollständige Blockade der HIV-1 Replikation bewirken (Fig. 4, Panel 4.

5 Experiment in A3.01).

Die Blockierung der Virusreplikation in Zellkulturen kann mechanistisch als Ergebnis der im Rahmen der Erfindung beschriebenen neuartigen Aktivitäten von Proteasom-Inhibitoren wie folgt begründet werden:

- In Gegenwart der Proteasom-Inhibitoren werden weniger Virionen freigesetzt,
- 10 - die wenigen freigesetzten Virionen haben eine geringe oder gar keine Infektiosität.

Dadurch wird die Neuinfektion von Zellen in der Kultur eingeschränkt, und die Ausbreitung der Infektion ist daher vermindert oder bricht vollständig ab.

Das Wesen der Erfindung liegt in der Verwendung bekannter Mittel zu einem neuen Zweck und in einer Kombination bekannter Elemente - den Proteasom-Inhibitoren - und einer neuen  
15 Wirkung - ihrem Einsatz zur Beeinflussung von Retroviren und von Hepadnaviren - die in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Vorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass nunmehr Mittel zur Hemmung der Freisetzung und Reifung von Retroviren sowie Mittel zur Behandlung, Therapie und Hemmung einer Virushepatitis zur Verfügung stehen.

Die Erfindung richtet sich ferner auf die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Herstellung  
20 von Mitteln zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Retroviren. Dazu gehört ihre Verwendung zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von AIDS und damit verwandter pathologischer Erscheinungen einer HIV-Infektion, wie zum Beispiel der HIV-induzierten Demenz, der HIV-induzierten Störungen im Lipidstoffwechsel, speziell dem HLS Syndrom (HIV-associated lipodystrophy syndrome) sowie von HIV-  
25 induzierten Störungen der Nierenfunktionen, speziell dem HIVAN Syndrom (HIV associated nephropathy).

In einem weiteren Teil, dem zweiten Schwerpunkt der Erfindung, wird überraschenderweise festgestellt, dass ähnlich zu dem Effekt auf Retroviren, Proteasom-Inhibitoren späte Prozesse im  
30 Replikationszyklus von Hepadnaviren hemmen. Dabei wurde spezifisch beobachtet, dass sich die erfindungsgemäße Verwendung von Proteasom-Inhibitoren dazu eignet, die Produktion von infektiösen Virionen von chronisch mit HBV infizierten Zellen weitgehend oder vollkommen zu unterbinden. Nach Behandlung von HBV-produzierenden Zellen mit Proteasom-Inhibitoren tritt sowohl eine Hemmung der Freisetzung von Virionen als auch eine nahezu vollständige

Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen ein. In Folge dieser neuartigen Aktivitäten können Proteasom-Inhibitoren die Virusreplikation und somit die Neuinfektion von Hepatozyten und damit die Ausbreitung einer HBV-Infektion *in vivo* in dem Lebergewebe eines HBV-Infizierten unterdrücken.

- 5 Ebenfalls wurde festgestellt, dass die Behandlung von chronisch mit HBV infizierten Hepato-Karzinomzellen mit Proteasom-Inhibitoren bevorzugt das Absterben (hauptsächlich durch Induktion von Apoptose) dieser Krebszellen induziert, während gesunde, primäre Hepatozyten und die anderen nicht proliferierenden Leberzellen sehr viel resistenter gegenüber einer Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren sind. Leberkarzinome sind medikamentös kaum  
10 behandelbar und führen in der Regel ohne Lebertransplantation oder Leberresektion zum Tod. Proteasom-Inhibitoren erlangen dadurch ein weiteres therapeutisches Potential für die Behandlung von Hepatitisvirus-Infektionen: Durch die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren kann nicht nur die Ausbreitung der Infektion (durch Blockierung der Produktion infektiöser Virionen), sondern auch die mit der Infektion verbundene Entstehung von Leberzellkarzinomen  
15 unterdrückt, verhindert oder ein bereits etabliertes Leberzellkarzinom geheilt werden. Dieser Anspruch beruht auf der Tatsache, dass die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren - ähnlich der bereits bekannten anti-neoplastischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf eine Vielzahl von Tumoren - eine spezifische Eliminierung von Leberkarzinomzellen *in vivo* bewirken kann. Die anti-neoplastische Wirkung von Proteasom-Inhibitoren wurde bislang nicht für  
20 Leberzellkarzinome gezeigt und stellt daher ein neuartiges therapeutisches Prinzip dar. Proteasom-Inhibitoren können somit zur Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von HBV-induzierter Leberzirrhose, insbesondere primären Leberzellkarzinomen eingesetzt werden.

- Weiterhin können Proteasom-Inhibitoren unter Verwendung der neuartigen anti-viralen Wirkung für die Behandlung von folgenden symptomatischen und symptomlosen Hepatitisvirus-  
25 Infektionen eingesetzt werden: Hepatitis-A-Virus (HAV), Hepatitis-C-Virus (HCV), Hepatitis-Delta-Virus (HDV), Hepatitis-E-Virus (HEV), Hepatitis-F-Virus (HFV), Hepatitis-G-Virus (HGV). Die Behandlung der Hepatitis B und C mit Proteasom-Inhibitoren ist wegen der weiten Verbreitung, der besonders hohen Pathogenität sowie wegen der Assoziation der chronischen Infektion mit der Entwicklung eines Leberkarzinoms von besonderer Bedeutung.

- 30 Die Proteasom-Inhibitoren können auch in Kombination mit anderen anti-Hepatitis-Medikamenten und sonstigen Therapieschemata eingesetzt werden, z.B. Interferon alpha/beta/gamma und Varianten hiervon (zum Beispiel pegylierte Interferone), Interleukine, Nukleosidanaloga (Lamivudine, Cidovir, Ribavirin und andere), Steroide, Plasma-Austausch,

Thymosin alpha 1, Impfstoffe, passive und aktive Vakzinierung, therapeutische und prophylaktische Vakzinierung, Glycyrrhizin, Stammzell-transplantation, Organtransplantationen, Nahrungstherapie, Immunsuppressiva, Cyclosporine und Derivate hiervon, Amanditin und Derivate, Interleukine und andere Cytokine, nicht Proteasom-selektive Protease-Inhibitoren, 5 Azathoprin, Hämodialyse, sowie hoch aktive antiretrovirale Therapie (highly active antiretroviral therapy, "HAART") bei Co-Infektionen von HBV mit Humanen Immundefizienzviren (HIV). Da Proteasom-Inhibitoren auch anti-virale Wirkung auf HIV ausüben, ist eine Behandlung von HBV/HIV-Koinfektionen, insbesondere in Kombination mit einer HAART-Therapie, ein Anwendungsschwerpunkt der Erfindung.

10

Eine Verhinderung des Krankheitsausbruches und eine Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus von symptomlosen HBV-infizierten Personen ist erfindungsgemäß ebenfalls mit Proteasom-Inhibitoren möglich.

15 Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren ist die Verhinderung der Etablierung einer systemischen Hepatitisvirus-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus (zum Beispiel bei Nadel-Stich-Verletzungen mit Virus-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten).

Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren ist die Vorbeugung einer Hepatitisvirus-Infektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, zum Beispiel bei Ärzten, Risiko- 20 Personal in Häusern mit hohem Besucherverkehr, Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für Hepatitis-Viren, in der Krankenbehandlung, für Familienangehörige von chronischen Virusträgern.

Eine weitere Verwendung von Proteasom-Inhibitoren ist die Verhinderung einer Re-Infektion mit HBV bei Leber- und anderen Organtransplantationen sowie bei Zelltherapien durch Gabe 25 der Mittel vor, während und einige Zeit nach der Transplantation. Die Gabe dieser Mittel ist angezeigt sowohl für die Hochrisikosituation bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben, welche die neuen Organe infizieren können, als auch für die Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten.

30 Die Prinzip-Lösung der Aufgabe wird am Beispiel von DHBV gezeigt. Es wird dargestellt, dass nach Zugabe von verschiedenen Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen Viruspartikeln aus bereits infizierten Zellen gehemmt wird.

Proteasom-Inhibitoren blockieren Freisetzung von infektiösen Viruspartikeln aus chronisch DHBV-infizierten Zellen

Erfindungsgemäß wird dieses Phänomen sowohl am Beispiel der Nichtinfizierbarkeit von primären Hepatozyten (Ente, Murmeltier, Tupaia und Mensch), von Gallengangszellen, von Mischkulturen aus Hepatozyten und Nichtheptozyten, von Zellen des hämatopoetischen System, als auch von etablierten Hepatomazellen mit Hepatitis B-, C- und D-Viren aus Proteasom-Inhibitoren-behandelten Zellen dargestellt. Darüber hinaus wird dies durch analoge Infektionsversuche in Tiermodellen *in vivo* dargestellt (uPA/RAG2-Mausmodell repopuliert mit Leberzellen aus Mensch, Murmeltier und Tupaia; mit Enten, Murmeltieren und Tupaias). Die Vorgehensweise ist, dass HBV-, HCV-, HDV-Viruspartikel und Kombinationen hiervon aus den Medien von Produzentenzellen, welche für unterschiedliche Zeiten und Dosen mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden, geerntet werden und die Infektiosität der Viruspartikel durch Infektion von Hepatitisvirus-freien Zellen getestet wird. Hierzu werden die oben genannten Zellen mit den Viruspartikeln inkubiert und anschließend die Infektion oder das Ausbleiben der Infektion durch Analyse der intra- und extrazellulären Komponenten von Nachkommenviren überprüft. Konkret wird der Status der Neusynthese von viralen Antigenen wie zum Beispiel Oberflächenproteine und Nukleokapsidprotein mittels Immunoblot, ELISA und metabolische Markierung getestet. Ebenfalls werden die Virusnukleinsäuren (RNA durch Northern, DNA durch Southern blots sowie PCR- und RT-PCR-Analysen) analysiert. Außerdem werden die viralen Antigene durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe von Virus-spezifischen Antikörpern mikroskopisch nachgewiesen.

Erfindungsgemäß wird am Beispiel von chronisch mit DHBV infizierten Entenhepatozyten gezeigt, dass nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren die Lebensfähigkeit der primären Hepatozyten nicht wesentlich beeinträchtigt ist, ebenso ist die Proteinsynthese in diesen primären Zellen nicht wesentlich blockiert. Jedoch wird im Rahmen der Erfindungsbeschreibung festgestellt, dass die freigesetzten Virionen faktisch nicht infektiös sind und daher keine Neuinfektion in primären Hepatozyten auslösen können. Im Ergebnis der Erfindung wird damit gezeigt, dass die Inhibierung des Proteasom-Pathway mittels Proteasom-Inhibitoren die Produktion von infektiösen DHB-Virionen blockiert, ohne dass dabei die Proteinsynthese von Leberzellen signifikant beeinträchtigt wird.

Die Prinzip-Lösung wird am Beispiel von primären Entenhepatozyten gezeigt, welche mit DHBV-Präparationen infiziert werden.

Chronisch mit DHBV infizierte primäre Entenhepatozyten, gewonnen durch Kollagenase-Behandlung aus der Leber von Entenembryonen (ausgebrütet aus kommerziell erwerblichen

Enteneiern), die häufig bereits mit DHBV infiziert sind, werden mit verschiedenen Klassen von Proteasom-Inhibitoren behandelt, inklusive solcher Proteasom-Inhibitoren, welche sich bereits in klinischer Testung für die Behandlung von Krebspatienten befinden (zum Beispiel die Proteasom-Inhibitoren PS-341, PS-273, PS-519). Nach der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren wird im Rahmen der Erfindung festgestellt, dass die behandelten Hepatozyten ihre Fähigkeit weitgehend oder vollständig verloren haben, infektiöse Viruspartikel zu produzieren. Aufgrund dieser neuartigen Aktivitäten von Proteasom-Inhibitoren ist davon auszugehen, dass die Applikation von *in vivo* verträglichen Proteasom-Inhibitoren die Infektionsausbreitung von Hepadnaviren im infizierten Organismus unterdrückt. Es ist weiterhin im Rahmen der Erfindung davon auszugehen, dass mit der neuartigen anti-viralen Strategie das Virusreservoir bei einer Hepadnavirus-Infektion vollständig eliminiert und damit eine teilweise oder vollständige Heilung einer viralen Hepatitis erzielt werden kann. Dieser Anspruch begründet sich insbesondere auf der Tatsache, dass mit dieser neuartigen Behandlung die Infektionsausbreitung und damit die Neuinfektion von Leberzellen verhindert werden kann. Auch wenn die intrazelluläre Synthese von viralen Proteinen und Nukleinsäuren in bereits infizierten Zellen nicht nachweisbar in der Menge reduziert wird, kann die Behandlung zur vollständigen Eliminierung des Virus führen, da Hepatitis-infizierte Zellen i.d.R. nur eine begrenzte Lebenszeit haben. Die Leberzellregeneration ist bei Patienten mit Leberentzündung besonders hoch. Deshalb sollten die in diesen Patienten häufiger entstehenden zunächst virusfreien Hepatozyten wegen der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren nicht *de novo* infiziert werden können.

Erfindungsgemäß wird gezeigt, dass der hemmende Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Virusvermehrung von Hepadnaviren folgende Mechanismen beinhaltet:

- 1) Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen;
- 2) Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen;
- 3) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in Kultur von primären Hepatozyten;
- 4) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in der Leber *in vivo*.

Zur Lösung der Aufgabe wurden im Rahmen der Erfindung verschiedene proteinchemische, molekular-virologische und immunhistologische Studien an HBV-infizierten Zellen durchgeführt. Erfindungsgemäß wird der durch Proteasom-Inhibitoren ausgelöste Defekt in der Infektiosität von Hepadnaviren mittels biochemischer Methoden dargestellt. Dazu wurden Western blot-Studien an DHBV-Proteinen durchgeführt.

Ebenfalls wird im Rahmen der Erfindungsbeschreibung die Blockierung der Neuinfektion von primären Hepatozyten mit Virus, welches auf Zellen behandelt mit Proteasom-Inhibitoren isoliert wurden, mittels Immunfluoreszenz-Messung ermittelt. Die dabei gewonnenen Informationen ermöglichen die Darstellung des hemmenden Effektes von Proteasom-Inhibitoren auf die Infektion von kultivierten primären Hepatozyten. Mit Hilfe dieser Methoden wird gezeigt, dass nach Behandlung von infizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren faktisch keine infektiösen Viruspartikel von der Zelle mehr freigesetzt werden können. Durch diese *in vitro* Infektionsstudien wird gezeigt, dass verschiedene Substanzklassen von Proteasom-Inhibitoren alle den gleichen Effekt auslösen: die Blockierung der Produktion von infektiösen Hepadnaviren.

Ferner wird erfindungsgemäß die durch die Wirkung der Proteasom-Inhibitoren reduzierte Infektiosität freigesetzter unreifer Hepatitis-B-Virionen mittels End-Punkt-Titrationsstudien in primären Hepatozyten dargestellt. Dabei wird gezeigt, dass allein eine Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren für 48 Stunden (etwa der Zeit eines HBV-Replikationszyklus) zu einer totalen Blockierung der Infektiosität führt, denn mit den verwendeten Methoden konnte faktisch kein Virus-Titer in den Zellkulturüberständen von Zellen beobachtet werden, welche mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden.

Erfindungsgemäß wird am Beispiel DHBV gezeigt, dass unter der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren die biochemische Modifizierung des Nukleokapsidproteins verändert ist. Überraschenderweise wird festgestellt, dass core-Proteine, welche unter Proteasom-Inhibitoren-Behandlung exprimiert werden, eine Veränderung des Molekulargewichtes zeigen. Diese neuartige Beobachtung lässt auf eine Veränderung der Phosphorylierung des Nukleokapsidproteins rückschließen. Im Ergebnis dieser Beobachtung wird daher festgestellt, dass die Veränderung in der Modifizierung des Nukleokapsidproteins die mechanistische Grundlage für die reduzierte Infektiosität der aus den mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Zellen sekretierten DHBV ist.

Im Rahmen der Erfindung wird erstmalig gezeigt, dass überraschenderweise nach Inaktivierung des UPS durch Behandlung von chronisch mit DHBV infizierten primären Hepatozyten die Freisetzung von infektiösen DHBV-Partikeln blockiert wird. Die spezifische Infektiosität der freigesetzten Virionen ist dramatisch erniedrigt. Mit allgemein üblichen Methoden der Infektiositätsbestimmung kann kein spezifischer Titer an neuproduzierten Viruspartikeln in den Zellkulturüberständen nachgewiesen werden, deshalb wurde ein Einzelinfektionstest angewandt (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 7). Erfindungsgemäß werden hierzu primäre

Entenhepatozyten, welche aus Lebern von Entenembryonen gewonnen und *in vitro* kultiviert wurden, mit DHBV-haltigen Zellkulturüberständen infiziert. Diese DHBV-haltigen Zellkulturüberstände wurden von chronisch mit DHBV infizierten primären Entenhepatozyten gewonnen, welche für zwei Tage mit 10 microM Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden. Zu einer parallelen Kultur wurden keine Inhibitoren zugesetzt. Zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 90-% der Hepatozyten einer primären Leberzellkultur befinden sich in der akuten Infektionsphase) wurde die Behandlung der Virus-produzierenden Kulturen begonnen. Die Menge an freigesetzten DHB-Virionen wird mittels DNA-dot-blot-Analyse der extrahierten DNA aus Viruspartikeln sowie mittels Western blot-Analyse des viralen core-Proteins untersucht. Dabei wurde eine 5- bis 10-fache Reduktion der freigesetzten DHB-Virionen beobachtet.

Die spezifische Infektiosität der neu produzierten DHB-Virionen wird mittels Titration in permissiven Kulturen an primären Entenhepatozyten ermittelt. Die Feststellung der Anzahl an infizierten Zellen erfolgt durch core- und preS-Immunfärbung. Bei Verwendung von verschiedenen Verdünnungen der Zellkulturüberstände als Inokkulum wird festgestellt, dass in Zellen, welche mit Zellkulturüberständen von den mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Kulturen inkubiert wurden, kein einziges Infektionsereignis nachweisbar ist. In keiner der für die Titration verwendeten Kulturen konnte eine neu-infizierte Zelle mittels Immunfluoreszenz für DHBV core- oder preS-Proteine festgestellt werden. Erfindungsgemäß wird mit diesem Ergebnis eine neuartige Aktivität von Proteasom-Inhibitoren beansprucht (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 8).

Diese neuartige Aktivität der Proteasom-Inhibitoren kann nicht auf rein unspezifische Beeinträchtigungen des Zellmetabolismus durch Abschaltung des UPS zurückgeführt werden, und zwar aus folgenden Gründen: Dieser Totalausfall an infektiösen DHB-Virionen ist nicht auf eine allgemeine Inhibierung der Proteinsynthese und DHBV-Expression in der Produzentenzelle zurückzuführen, da zum einen während der 2-tägigen Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren keine toxischen Effekte in den primären Entenhepatozyten beobachtet wurden, und zum anderen die Analyse der Expression von intrazellulären DHBV-Proteinen mittels Western blot-Technik keinen signifikanten Effekt der Proteasom-Inhibierung auf die Expression des DHBV-core-Proteins zeigte (siehe Ausführungsbeispiel 8).

Die Effizienz der Proteasom-Inhibitoren hinsichtlich der Blockierung des Proteasom-Pathway in den behandelten Hepatozyten wurde mittels Western blot-Analyse nachgewiesen unter Verwendung von Antikörpern, welche poly-ubiquitinierte Proteine erkennen. Es ist deutlich,

dass bei allen getesteten Proteasom-Inhibitoren eine deutliche Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen erfolgt. Somit kann festgestellt werden, dass diese Inhibitoren in primären Hepatozyten voll wirksam sind.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird gezeigt, dass die Behandlung von chronisch mit HBV infizierten humanen Hepatom-Zelllinien mit Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von HBV-spezifischen Proteinen, insbesondere von HBs- und HBe-Antigen bewirkt (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 10). Ähnlich der Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf DHBV wurde eine deutliche Inhibierung der Sekretion von HBV-Proteinen beobachtet.
- 10 In einer weiteren Form der Erfindung wird gezeigt, dass aufgrund der neuartigen Wirkung auf Freisetzung und Infektiosität von Hepatitis-Viren Proteasom-Inhibitoren die Ausbreitung einer HBV-Infektion in kultivierten Hepatozyten verhindern. Erfindungsgemäß wird dabei nachgewiesen, dass durch die Sekundärinfektion, das heißt die Übertragung einer bereits etablierten Infektion auf benachbarte Zellen, komplett verhindert wird. Dieser inhibitorische
- 15 Effekt auf die Sekundärinfektion wurde in primären Entenhepatozyten nachgewiesen, welche nach Primärinfektion für mehrere Tage mit Proteasom-Inhibitoren behandelt wurden. Entsprechend der neuartigen Effekte von Proteasom-Inhibitoren wurde in den behandelten primär infizierten Zellen sowohl eine geringere Expression der viralen Antigene als auch wegen der Blockade der Sekundärinfektion eine geringere Zahl an neu infizierten Zellen festgestellt
- 20 (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 8).
- Erfindungsgemäß ist dieser inhibitorische Effekt der Proteasom-Inhibitoren auf die DHBV-Sekundärinfektion vergleichbar mit der pharmakologischen Wirkung der Droge Suramin, von der bekannt ist, dass sie selektiv eine HBV-Sekundärinfektion blockiert, ohne dabei mit der bereits etablierten primären Infektion zu interferieren. Im Unterschied zu den verwendeten
- 25 Proteasom-Inhibitoren ist Suramin jedoch eine sehr toxische Substanz, welche *in vivo* für die Behandlung von Hepatitis-Infektionen nicht verwendet werden kann. Darüber hinaus - und im Gegensatz zu Suramin - führt die Hemmung der Proteasom-Aktivität additiv zu einer Reduktion der HBV-Genexpression und bewirkt erfindungsgemäß die Überlagerung zweier antiviraler Effekte von Proteasom-Inhibitoren, die Inhibierung sowohl der Primär- als auch der
- 30 Sekundärinfektion.

Proteasom-Inhibitoren induzieren Zelltod von Leberkarzinomzellen, während primäre Hepatozyten relativ resistent gegenüber Proteasom-Inhibitoren sind



In einem weiteren Teil der Erfindung wird gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren den Zelltod von Leberkarzinomzellen induzieren. Erfindungsgemäß wird am Beispiel von kultivierten Entenhepatozyten gezeigt, dass primäre Leberzellen relativ resistent gegenüber Proteasom-Inhibitoren bis zu einer Konzentration von ca. 10 microM sind, während Leberkarzinomzellen bereits bei 100-fach niedrigeren Konzentrationen von Proteasom-Inhibitoren abgetötet werden.

Die Induktion des Zelltodes (ausgelöst durch apoptotische, nekrotische oder andere Prozesse) in HBV-produzierenden Leberkarzinom-Zellen nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren wird erfindungsgemäß am Beispiel von humanen Leberkarzinomzelllinien (zum Beispiel HepG.2.2.15) dargestellt. Nachgewiesen wird dieser neuartige Mechanismus mittels Trypanblau-Ausschlussfärbung (lebende Zellen werden nicht gefärbt, tote Zellen nehmen den Farbstoff auf), durch Nachweis der Annexin-V Oberflächenexposition durch Immunfluoreszenz, durch Detektion der DNA-Fragmentierung, durch Immunoblot-Nachweis und Fluoreszenzfärbungs-Nachweis von prozessierten und aktivierten Caspasen und enzymatischen Nachweis der Caspaseaktivität. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden eine Hühnerhepatomazelllinie (LMH) und primäre Hepatozyten aus Enten (DHBV-infiziert und nicht-infiziert) sowie Hühnern (nicht DHBV-infiziert) auf selektive Toxizität hinsichtlich Proteasom-Inhibitoren für Hepatomazellen im Verbund mit nicht transformierten Hepatozyten getestet.

Das bevorzugte Absterben von Leberkarzinomzellen begründet sich erfindungsgemäß in der anti-neoplastischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren. Beispielsweise besitzt der bekannte Proteasom-Inhibitor PS-341 eine selektive zytotoxische Aktivität gegen ein breites Spektrum an humanen Tumorzellen, eine Aktivität, welche mit der Akkumulation von p21 und Zellzyklus-Arrest in der G2-M-Phase mit nachfolgender Apoptose verbunden ist. Die Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 wird ebenfalls durch die Wirkung von Proteasom-Inhibitoren beeinträchtigt. Erfindungsgemäß kann durch diese und andere Mechanismen die gezielte Eliminierung von Leberkarzinomzellen bewirkt werden, welche infolge einer HBV-Infektion und HCV-Infektion oder entsprechender Koinfektion mit beiden Viren oder mit HDV/HBV-Koinfektion mehr als 100 mal häufiger entstehen als bei nicht-infizierten Zellen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird erstmals festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren relativ geringe toxische Effekte in primären Hepatozyten auslösen, jedoch ein bevorzugtes Absterben von Leberkarzinomzellen bewirken. Erfindungsgemäß wird hierzu gezeigt, dass primäre Hepatozyten tagelange Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren bis zu Konzentrationen von 10 microM tolerieren. Im Unterschied dazu sterben humane

Leberkarzinomzellen bereits bei 1000-fach niedrigeren Konzentrationen an Proteasom-Inhibitoren (siehe hierzu Ausführungsbeispiel 9). Die unterschiedliche Toxizität von Proteasom-Inhibitoren auf primäre Hepatozyten im Vergleich mit humanen Hepatoblastoma-Zellen wurden mittels Dosis-Limitierungsstudien mit Proteasom-Inhibitoren untersucht. Die Vitalität der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Parallele Kulturen wurden mit steigenden Konzentration an Proteasom-Inhibitoren (10 microM, 3 microM, 1 microM, 10 nanoM und 1 nanoM) für mehrere Tage behandelt. Zusätzlich wurde die Funktionalität der Hepatozyten mittels Fluoreszenzvitalfärbung bestimmt. Dabei wurde erfindungsgemäß festgestellt, dass primäre Entenhepatozyten relativ hohe Konzentrationen von Proteasom-Inhibitoren bis zu ca. 10 microM tolerieren können, während proliferierende Leberkarzinomzellen sehr viel sensibler gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren sind.

#### Verwendung von Proteasom-Inhibitoren in der Behandlung von Infektionen mit Hepatitisviren

Das in der Erfindungsbeschreibung dargestellte Prinzip der Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung einer Infektion mit Hepadnaviren ist neuartig in Hinsicht auf die Verwendung einer bereits bekannten Substanzklasse (den Proteasom-Inhibitoren) für eine neue Aktivität, welche sich in folgenden therapeutischen Konzepten zusammenfassen lässt:

- die Blockierung der Produktion von infektiösen Hepadnaviren und damit die Verhinderung der Infektionsausbreitung *in vivo*, dem Lebergewebe einer infizierten Person;
- die Induktion des Absterbens von Leberkarzinomzellen, welche in direkter oder indirekter Folge einer Infektion mit Hepadnaviren entstanden sind.

Gleichzeitig ist die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren auch neuartig hinsichtlich des Anwendungsprinzips. Bislang sind keine Substanzen / Prinzipien / Methoden bekannt, welche späte Prozesse der Replikation von Hepadnaviren, speziell der Freisetzung von infektiösen Virionen beeinflussen. Weiterhin ist neu, dass die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Blockierung der Replikation von Hepatitisviren führt. Dieser Inhibitionsmechanismus ist in allen Wirtszellen des Virus, den Leberhepatozyten, konserviert. Im Vergleich zu bisherigen antiviralen Methoden der Behandlung von Hepatitis-Infektionen, welche essentielle Komponenten des Virus direkt treffen, ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Resistenzmechanismen bei Applikation von Proteasom-Inhibitoren in der Behandlung von Hepadnavirus-Infektionen um Größenordnung geringer. Die Neuartigkeit dieses Wirkprinzips von Proteasom-Inhibitoren zeigt sich auch in der Tatsache, dass Proteasom-Inhibitoren ein breites Wirkungsspektrum gegenüber unterschiedlichen Hepatitisviren (HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV) besitzen. Der

inhibitorische Effekt wurde im Rahmen der Erfindung mit gleicher Intensität bei verschiedenen primären als auch klonierten Hepatitisviren beobachtet.

Neuartig ist weiterhin das Prinzip der Wirkung von Proteasom-Inhibitoren, die die Produktion von infektiösen Viruspartikeln von bereits mit Hepadnaviren infizierten Zellen verhindern.

5 Dadurch wird wesentlich die Menge an infektiösen Virionen (Viruslast) und somit die Infektionsausbreitung *in vivo* reduziert.

In der Summe dieser neuartigen Mechanismen lässt sich feststellen, dass die verminderte Freisetzung von noch dazu wenigen oder gar nicht infektiösen Viruspartikeln im Netto-Effekt bei gleichzeitigem Zelltod von Virus-produzierenden Karzinomzellen im Falle einer *in vivo*  
10 Anwendung von Proteasom-Inhibitoren die Menge an infektiösen Virionen in einem mit Hepadnaviren infizierten Organismus verringert. Somit wird insgesamt die Zahl infizierter Produzentenzellen im Leberzellgewebe reduziert. Dies macht die Anwendung von Proteasom-Inhibitoren allein oder in Kombination mit bereits in der anti-viralen Therapie von Hepadnaviren verwendeten Therapeutika attraktiv.

15 Im Rahmen der Erfindung wird erstmals festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren sowohl die Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion hemmen als auch die Sekundärinfektion und somit die Ausbreitung einer Infektion mit Hepatitisviren *in vivo*, in Hepatozyten komplett blockieren. Entsprechend der vorliegenden Erfindung sind Proteasom-Inhibitoren geeignete Substanzen, um die Ausbreitung einer HBV-Infektion *in vivo* zu  
20 blockieren.

Der wesentliche Vorteil der Erfindung besteht darin, dass mit der Behandlung von Proteasom-Inhibitoren zwei für die Bekämpfung viraler Hepatitis-Infektionen wesentliche Effekte ausgelöst werden können: Zum einen wird die Produktion von infektiösen Viruspartikeln und damit die Infektionsausbreitung im Organismus gehemmt. Zum anderen wird die Entstehung, das  
25 Wachstum und die Metastasierung von Leberzelltumoren verhindert, welche infolge einer Hepatitisvirus-Infektion nach einer Latenzphase sehr häufig auftritt. Darüber hinaus werden bereits bestehende Leberkarzinome durch die Proteasom-Inhibitoren zerstört, nicht aber die wenig oder nicht proliferierenden normalen Zellen der Leber.

Aufgrund dieser neuartigen Behandlungsmethode können daher vielfältige therapeutische  
30 Effekte durch den Einsatz von Proteasom-Inhibitoren bei Infektionen mit Hepadnaviren ausgelöst werden. Neben der Blockierung der Infektiosität der freigesetzten Viren sowie der Verhinderung von Leberzellkarzinomen besteht ein weiterer Vorteil dieser Behandlungsmethode darin, dass mit dieser Strategie zelluläre Faktoren getroffen werden, welche für die Replikation von Hepadnaviren essentiell sind, jedoch eine sehr viel höhere genetische Stabilität im Vergleich

zu viralen Faktoren beinhalten. Aufgrund dieser genetischen Stabilität der Zielstruktur dieser neuartigen anti-viralen Strategie ist mit dem Auftreten von Resistenz-Erscheinungen, wie sie für viele der bislang bekannten Inhibitoren einer HBV-Infektion bekannt sind, nicht zu rechnen. Insbesondere gilt dies für die Polymerasemutanten von Hepatitis B und C Viren, die bei Nukleosidanaloga-Behandlung so gut wie immer nach einer relativ kurzen Zeit auftreten. Dies gilt auch für Immunescape-Varianten, wie sie bei passiv und aktiv Vakzinierten sowie natürlicherweise auftreten. Gleiches gilt für Interferon-resistente Stämme von HBV und HCV. Auf diesem neuartigen Effekt von Proteasom-Inhibitoren beruht der erfinderische Anspruch, dass mit der Behandlung von Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Ausbreitung einer HBV-Infektion verhindert, sondern auch durch HBV verursachte Leberzellkarzinome therapiert werden können.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1: Behandlung von HIV-1 infizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren reduziert die Infektiosität von freigesetzten Viruspartikeln.

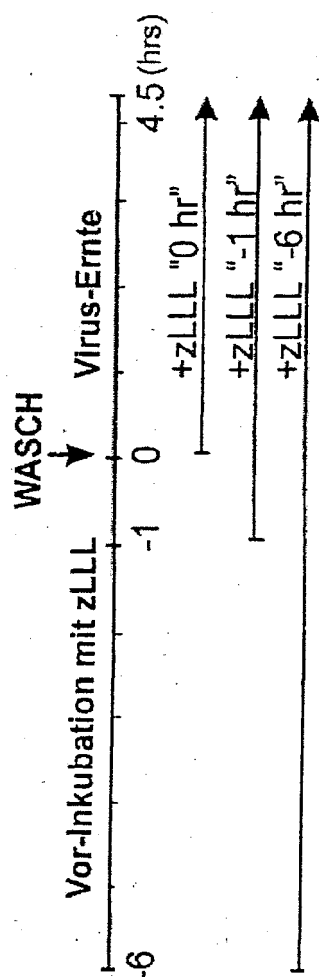
Kulturen von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, A3.01 wurden mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert und für ca. 7 Tage in RPMI kultiviert. Ca. 80% des Zellkulturmediums wurde alle zwei Tage erneuert. Zur Bestimmung der Menge an freigesetzten Viruspartikeln wurden Proben der Zellkulturüberstände auf Aktivität von Virus-assoziiierter RT untersucht. Weiterhin wurde die Infektionsausbreitung durch indirekte Immunfluoreszenz mit anti-CA Antikörpern verfolgt. Der Zeitpunkt der maximalen Infektionsausbreitung in der Kultur wurde anhand der RT-Akkumulation sowie der Synzytia-Formierung ermittelt. Zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 7 Tage nach Infektion) wurden frische nicht infizierte A3.01 Zellen der infizierten Kultur im Verhältnis 1:1 gemischt und für weitere 24 h inkubiert. Dies ermöglicht eine quasi-Synchronisation der Infektion und eine maximale Zahl an infizierten Zellen mit maximaler HIV-Expression zu einem gegebenen Zeitpunkt. Die Zellen wurden in parallele Kulturen aufgeteilt, mit PBS gewaschen und für 4.5 Stunden mit 40 microM zLLL im Medium behandelt. Das Waschen der Zellen und die Kultivierung in frischem Medium war notwendig, um die neuproduzierten Viren während der 4.5 Stunden Erntezeit zu verfolgen (+zLLL "0hr"). Es bestand die Annahme, dass eine

- gewisse, der HIV-1 Assemblierung entsprechende, ca. eine Stunde lange lack-Phase besteht zwischen dem Beginn der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren und der Freisetzung defekter Virionen. Um die Virus-Produktion von Zellen mit inaktivierten Proteasomen zum Beginn der Erntezeit zu verfolgen, wurden parallele Kulturen für eine (+zLLL "-1hr") oder 6 Stunden (+zLLL "-6hr") vor dem Wasch-Schritt mit 40 microM zLLL vorbehandelt. Eine parallele Kultur wurde ohne Inhibitor inkubiert (kein zLLL). Die Virus-haltigen Zellkulturüberstände wurden gesammelt, filtriert, und die Menge an Gag-Proteinen wurde mittels eines standardisierten Capture-ELISA unter Verwendung von Epitop-differenten anti-CA-Antikörpern quantifiziert. Die daraus kalkulierte Virusfreisetzung ist als nanog p24<sup>CA</sup>/ml Zellkulturmedium in Tabelle 1 dargestellt. Die Infektiosität der Kulturüberstände wurde mittels Endpunkttitration (detailliert in Beispiel 6d) ermittelt und ist als TC<sub>ID50</sub> in Tabelle 1 angegeben. Die spezifische Infektiosität wurde als der Quotient von TC<sub>ID50</sub> zur Gesamt-Menge an Gag ermittelt und ist als prozentualer Anteil der Infektiosität zur Kontroll-Kultur (kein zLLL = 100%) in Tabelle 1 angegeben. Dabei zeigt sich, dass sowohl die Freisetzung an Gag-Proteinen als auch die Infektiosität der freigesetzten Virionen nach zLLL-Behandlung gehemmt wird. Dieser Effekt nimmt mit der Zeit zu, nach 4.5 Stunden tritt eine 84%ige und nach weiteren 6 Stunden Vorbehandlung eine 98%ige Reduktion an infektiösen Virionen im Zellkulturmedium auf (Tabelle 1).
- CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A3.01) wurden mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert und zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 7 Tage post Infektion) parallele Kulturen entweder ohne oder für 1 (+zLLL "-1hr") beziehungsweise 6 Stunden (+zLLL "-6hr") mit 40 µM zLLL behandelt. Danach wurden die Zellen gewaschen und für weitere 4.5 Stunden mit oder ohne 40 µM zLLL inkubiert. In einer parallelen Kultur wurden Zellen unmittelbar nach dem Waschen mit 40 µM zLLL behandelt (+zLLL "0hr"). Die Virus-haltigen Überstände wurden gesammelt, und die Menge an CA-Antigen wurde mittels ELISA quantifiziert. Die spezifische Infektiosität wurde als der infektiöse Virustiter per nanog CA ermittelt und im Verhältnis zu der nicht behandelten Kontroll-Kultur (100%) dargestellt.

Tabelle 1: MR13/3/53M-MB A 8M/CM

Proteasom-Inhibitoren verringern die Infektiosität von freigesetzten Viruspartikeln.

5



| Behandlung     | Virus-freisetzung<br>ng p24 <sup>ca</sup> / ml | Virus-titer/ml<br>TC <sub>100</sub> | Infektiosität<br>Titer/ng p24 <sup>ca</sup> | Infektiosität<br>% of "no zLLL" |
|----------------|--|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| kein zLLL      | 263  | $1.9 \times 10^7$                   | $7.2 \times 10^4$                           | 100                             |
| +zLLL, "0 hr"  | 122  | $1.2 \times 10^6$                   | $1.0 \times 10^4$                           | 14                              |
| +zLLL, "-1 hr" | 88   | $4.4 \times 10^5$                   | $5.0 \times 10^3$                           | 7                               |
| +zLLL, "-6 hr" | 26   | $3.8 \times 10^4$                   | $1.5 \times 10^3$                           | 2                               |

**Beispiel 2: Elektronenmikroskopische Analyse HIV-1 infizierter MT-4 Zellen nach Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren.**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen, MT-4, wurden mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert und für ca. 4 Tage in RPMI kultiviert. Zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion wurden die Zellen gewaschen, in Zellulose-Kapillaren gesaugt und für 5 Stunden mit 50 µM (microMol) zLLL behandelt. Die experimentellen Details der Fixierung, der Dünnschnittpräparation und der Transmissionselektronenmikroskopie sind in Beispiel 6e aufgeführt. Repräsentative Ausschnitte von elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in Figur 1 dargestellt.

**Beispiel 3: Proteasom-Inhibitoren hemmen Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung von infizierten T-Zellkulturen und transfizierten HeLa-Zellen.**

Zur biochemischen Analyse der hemmenden Wirkung von Proteasom-Inhibitoren auf die Kinetik der Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung wurden pulse/chase-Analysen durchgeführt.

Die experimentellen Details der Infektion, Kultivierung, DNA-Transfektion und pulse/chase-Experimente sind in Beispiel 6g angegeben. Hierzu wurden entweder HIV-1 infizierte CD4<sup>+</sup> T-Zellkulturen oder Kulturen von HeLa-Zellen eingesetzt, welche mit proviraler DNA von HIV-1<sub>NL4-3</sub> oder HIV-2<sub>ROD10</sub> transfiziert wurden. In der Regel wurden parallele Kulturen zum Zeitpunkt der maximalen Expression von HIV-Proteinen für 30 min einer Methionin-Depletion unterzogen, anschließend für 30 min mit [<sup>35</sup>S]-markierten Methionin metabolisch pulse-markiert und nachfolgend in einem chase-Medium mit einem Überschuss an nicht-radioaktiv markiertem Methionin für einen Zeitraum von 8 Stunden inkubiert. Die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren begann in der Regel mit dem Zeitpunkt der Methionin-Depletion und wurde über den gesamten Versuchszeitraum (Depletions-, pulse-, und chase-Phase aufrecht erhalten). Proteasom-Inhibitoren wurden entweder selektiv (10 microM zLLL, Figur 2, Panel "HIV-1 in HeLa") oder in Kombination (10 microM zLLL und 10 microM LC, Abbildungen 2, Panels "HIV-1 in HeLa" und "HIV-2 in HeLa") eingesetzt. Aliquote Zellkulturen wurden zu jedem Zeitpunkt des chases gewonnen und durch Zentrifugation in Zell-, Virus- und Zellkulturüberstand-Fractionen aufgetrennt. Die radioaktiv markierten HIV-Proteine wurden mittels Standard-Immunpräzipitation unter Verwendung von AIDS-Patientenseren sowie Gag-spezifischen Antikörpern unter Verwendung von bereits beschriebenen Methoden (Schubert *et al.*, 1998) isoliert, im SDS-PAGE aufgetrennt, und anschließend durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die Quantifizierung erfolgte mittels Image-Analyse. In der Regel wurden die relativen Mengen an Gag-Polypeptid und dem Hauptprozessierungsprodukt CA (capsid) für jeden chase-

Zeitpunkt jeweils in der Zell-, Virus- und der Zellkultur-Fraktion bestimmt. Die Kinetik von Virusfreisetzung wurde als der prozentuale Anteil von Gag-Proteinen in der Virus-Fraktion relativ zu der Gesamt-Menge an Gag (ermittelt in den Zell-, Virus-, und Zellkultur-Fraktionen) pro Zeitpunkt des chases dargestellt. Die Kinetik der intrazellulären Gag-Prozessierung wurde  
5 als der Quotient der Mengen von CA durch Pr55 über den gesamten chase-Zeitraum berechnet (Figur 2, Panel "HIV-1 in HeLa").

#### Beispiel 4: *In vitro* Gag-Prozessierung von Pr55.

Rekombinantes HIV-1 Gag-Polyprotein Pr55 wurde in Insektenzellen und rekombinante HIV-1  
10 Protease wurde in *E. coli* hergestellt. Die experimentellen Details der Expression, Reinigung, und der Bestimmung der enzymatischen Aktivität wie auch der Durchführung der *in vitro* Spaltreaktionen und Western blots sind im Beispiel 6f näher erläutert. Die Enzym-Substrat-Verhältnisse (Protease-Pr55-Verhältnis) wurde so gewählt, dass eine relativ langsame Substrat-Umsetzung auftrat. Nach 30 min Reaktion wurden ca. 50% von Pr55 gespalten. Unter diesen  
15 Bedingungen können selbst schwach hemmende Effekte auf die enzymatische Aktivität der Protease ermittelt werden. Unter diesen sensitiven Bedingungen konnte keine Inhibierung der Protease-Aktivität festgestellt werden, selbst nicht unter Bedingungen, bei denen beide Inhibitoren, zLLL und LC, in einer 10-fach höheren Konzentration als in der Zellkultur getestet wurden (Fig. 3, Reaktionen 4-9). Als Kontrolle: Der HIV-1 spezifische Proteasom-Inhibitor  
20 Saquinavir bewirkt einen vollkommenen Block der *in vitro* Prozessierung (Fig. , Reaktion 10).

#### Beispiel 5: Proteasom-Inhibitoren hemmen HIV-1 Replikation in Zellkultur.

Parallel-Kulturen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in frischem RPMI-Medium inkubiert und mit einem definierten Virus-Stock von gereinigtem HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert. In der Regel wurde 1 RT-  
25 Unit pro Zelle zur Infektion eingesetzt. Einen Tag nach der Infektion wurden die Zellen in PBS gewaschen, mit frischem Medium versetzt, welches verschiedene Konzentrationen an den Proteasom-Inhibitoren zLLL (Fig. 4, Panels "1. bis 3. Experiment in A3.01") oder Epoxomicin (Fig. 4, Panel "4. Experiment in A3.01")  
enthielt. Alle zwei Tage wurden Proben von Zellkulturüberständen gewonnen, eingefroren und  
30 später zur Bestimmung der RT-Aktivität eingesetzt. Gleichzeitig wurden 80% des Zellkultur-Mediums erneuert und mit frischen Proteasom-Inhibitoren versetzt. Die Proteasom-Inhibitoren wurden als 10 mM (milliMol) Stock-Lösungen in 75% Ethanol eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde eine parallele Kultur mit 20 microM Ethanol versetzt. Die Reverse



Transkriptase-Aktivität wurde in den zellfreien Zellkulturüberständen bestimmt und gegen die Zeit der Zellkultur aufgetragen (Fig. 4).

#### Beispiel 6: Material und Methoden.

5

##### Beispiel 6a: Molekulare HIV-1-Klone.

Zur Herstellung von T-Zell-tropen Viren des molekularen Klons HIV-1<sub>NL4-3</sub> wurde das bereits publizierte Plasmid pNL4-3 (Adachi *et al.*, 1986) verwendet und für die Herstellung von Makrophagen-tropen Viren das bereits publizierte Plasmid pNL4-3(AD8) (Schubert *et al.*, 1995) und pAD8 (Theodore *et al.*, 1995). Für die Expression von HIV-2<sub>ROD10</sub> in HeLa-Zellen wurde das bereits publizierte Plasmid pROD10 (Bour *et al.*, 1996) verwendet.

##### Beispiel 6b: Zellkultur.

CD4<sup>+</sup> humane T-Zell-Lymphom-Zelllinien, H9, A3.01, C8166, und MT4, wurden in RPMI 1640 mit 10% (V/V) fötalem Kälberserum, 2 millim L-Glutamin, 100 U ml<sup>-1</sup> Penicillin und 100 mg (millig) ml<sup>-1</sup> Streptomycin kultiviert. HeLa-Zellen (ATCC CCL2) wurden in Dulbeccos' modifizierten Eagle's Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum, 2 millim L-Glutamin, 100 U ml<sup>-1</sup> Penicillin, und 100 millig ml<sup>-1</sup> Streptomycin kultiviert.

##### Beispiel 6c: Transfektion und Gewinnung von Virusstocks.

Für die Herstellung von Virus-Präparaten wurde Plasmid-DNA von molekularer HIV-1- oder HIV-2-DNA unter Anwendung der Kalzium-Phosphat-Präzipitationsmethode in HeLa-Zellen transfiziert. Dazu wurden konfluente Kulturen von HeLa-Zellen (5x10<sup>6</sup> Zellen) mit 25 µg (microg) Plasmid DNA in Kalziumphosphat-Kristallen hergestellt, inkubiert und anschließend einem Glycerol-Schock unterzogen. Für die Gewinnung von konzentrierten Viruspräparaten wurden zwei Tage nach Transfektion die Zellkulturüberstände geerntet. Anschließend wurden die Zellen sowie deren Bestandteile durch Zentrifugation (1,000 x g, 5 min, 4°C) und Filtration (0.45 µm - microm Porengröße) abgetrennt. Viruspartikel wurden durch Ultra-Zentrifugation (Beckman SW55 Rotor, 1.5 hr, 35,000 rpm, 10°C) pelletiert und nachfolgend in 1 ml of DMEM Medium resuspendiert. Die Viruspräparate wurden durch Filtration sterilisiert (0.45 microm Porengröße) und portioniert eingefroren (-80°C). Einzelne Viruspräparate wurden durch Bestimmung der Reverse Transkriptase-Aktivität unter Verwendung von [<sup>32</sup>P]-TTP Einbau in ein oligo(dT)-poly(A) Template standardisiert.

**Beispiel 6d: Infektiositätsassay.**

Akute mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> infizierte A3.01-Zellen wurden mit 40 µM zLLL für verschiedene Zeiten behandelt, wie im Ausführungsbeispiel 1 angegeben. Zellfreier Zellkulturüberstand wurde geerntet und filtriert (Poren-Größe = 0.45 µM). Der relative Betrag an freigesetzten Virionen wurde mittels eines p24<sup>CA</sup>-Antigen Capture ELISA quantifiziert. Zum Zweck der Virus-Titration wurden jeweils 8 parallele Kulturen von C8166 Zellen infiziert mit den jeweiligen Virus-Präparaten, in einer seriellen 10-fachen Verdünnung infiziert. Der Infektiositätstiter wurde bestimmt als 50% Zellkultur infektiöse Dosis (TCID<sub>50</sub>), und zwar indem die Synzytia-Formierung je Kultur und Verdünnungsstufe am Tag 10 post infectionem ermittelt wurde. Die spezifische Infektiosität wurde für jede Probe standardisiert zu dem Betrag an ermittelten p24<sup>CA</sup> Antigenen in jedem Virus-Inokulum.

**Beispiel 6e: Elektronenmikroskopie.**

Akut mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> infizierte MT-4 Zellen wurden für 2.5 Stunden in frischem Medium mit bzw. in einer parallelen Kultur ohne Proteasom-Inhibitor (50 µM zLLL) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Zellulose-Kapillaren gesaugt, die Kapillaren wurden verschlossen und für weitere 2.5 Stunden in frischem Medium mit oder ohne 50 µM zLLL weiter kultiviert. Die Kapillaren wurden gewaschen, und die Zellen wurden für eine Stunde in 2.5% Glutaraldehyd in Phosphat gepufferter Saline (PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Kapillaren in PBS gewaschen und nachfixiert in 1% OsO<sub>4</sub> in PBS, erneut gewaschen in Wasser, gefärbt in 1% Uranyl-Acetat in Wasser, sowie abschließend dehydratisiert in einem steigenden Gradienten an serieller Verdünnung von Ethanol. Die gesamten Kapillaren wurden in ERL-Harz eingebettet für nachfolgende ultra-Dünnschnitte. Die Ultra-Dünnschnitte wurden gegengefärbt mit 2% Uranyl-Acetat und Blei-Zitrat. Mikro-Aufnahmen wurden mit einem Philips CM120 Transmissions-Elektronenmikroskop bei 80 kV aufgenommen.

**Beispiel 6f: *In vitro* Prozessierung von Gag-Proteinen.**

Myristyliertes Pr55 von HIV-1 wurde aus Virus-ähnlichen Partikeln produziert, welche von Insektenzellen infiziert mit rekombinanten Baculovirus Gag12myr freigesetzt wurden. Die Virus-ähnlichen Partikel wurden durch Zentrifugation durch ein 20% Sucrose-Kissen gereinigt. Rekombinante HIV-1 Protease exprimiert in *E. coli* wurde mittels Gelfiltrations-Chromatographie an Superose12 gereinigt. Die Enzymkonzentration wurde mittels active-site-Titration ermittelt. Für Spaltreaktionen wurde allgemein 1 µM Pr55 mit 40 nM (nanoMol) PR in Reaktionspuffer (50 mM MES pH 6.5, 300 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.1% Triton-X

100) bei 37°C für 30 min inkubiert. Um eine maximal Sättigung von PR mit Inhibitoren zu garantieren, wurde PR mit den jeweiligen Inhibitor für 5 min vor dem Start der Spaltreaktionen vorinkubiert. Die Spaltreaktionen wurden durch Zugabe von SDS-sample Puffer und Kochen der Probe für 10 min gestoppt. Die Spaltprodukte wurde im 10% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western blot nachgewiesen. Dazu wurden anti-CA spezifische Antikörper eingesetzt, die mittels anti-Kanichen-IgG-Peroxidase-Konjugat und Chemiluminiszenz-Reaktion nachgewiesen wurden.

**Beispiel 6g: Metabolische Markierung, pulse/chase-Analyse und Immunpräzipitation.**

10 Für pulse/chase-Analysen wurden HIV-1 oder HIV-2 exprimierende Zellen, entweder infizierte T-Zellen oder transfizierte HeLa-Zellen, für 30 min in Methionin-freiem RPMI-Medium inkubiert (Methionin-Depletion). Danach folgte eine metabolische pulse-Markierung mit [<sup>35</sup>S]-Methionin (spezifische Aktivität = 2 milliCi/ml) in RPMI für 30 min. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, aliquotiert und in parallelen Kulturen in komplettem DMEM mit 10 milliM nicht  
15 radioaktivem Methionin weiter inkubiert (chase). Zu bestimmten Zeitpunkten des chases (in der Regel 0, 0.5, 1, 2, 4 und 8 Stunden nach pulse-Markierung) wurden die Zellen geerntet und unmittelbar danach auf Trockeneis eingefroren. Die zellfreien Virionen wurden isoliert durch Zentrifugation der Zellkultur-Überstände (bei 4°C und 18,000xg, für 100 min). Extrakte von Zell- und Viruspellets wurden mittels Detergenzien hergestellt und Aliquote von der Zell-, der  
20 Virus-, und der Zellkultur-Überstände, erhalten nach Zentrifugation, wurden mit Antikörpern behandelt, die zuvor an Protein-G-Sepharose gekoppelt wurden. In der Regel wurde Serum von HIV-1 oder HIV-2 seropositiven Individuen wie auch anti-CA Antikörper, hergestellt in Kaninchen, für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden mit Detergenzhaltigen Puffern gewaschen, in SDS-Probenpuffer denaturiert und anschließend mittels  
25 Gelelektrophorese in 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden in Lösungen von 50% Methanol und 10% Essigsäure fixiert und anschließend für 1 Stunde in 1 M Salizylsäure behandelt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Fluorographie bei -80°C sichtbar gemacht. Die relative Menge der markierten Proteine, speziell der Gag-Polypoteine und der CA-Prozessierungsprodukte wurden mittels Phosphor-Image-Analyzer bestimmt.

30 **Beispiel 7: Hemmung der Proteasom-Aktivität hat keinen wesentlichen Einfluss auf die intrazelluläre virale Genexpression, blockiert jedoch drastisch die Freisetzung von Viruspartikeln aus chronisch DHBV-infizierten Hepatozyten.**

Primäre Entenhepatozyten und anderen Nichtparenchymzellen der Leber wurden aus Entenembryonen durch Kollagenase-Behandlung im wesentlichen nach einer bereits beschriebenen Methode gewonnen (Köck *et al.*, 1993). Befruchtete Pekingenteneier wurden von einer Zuchtfirma (Wichmann, Deutschland) käuflich erworben. Die Bebrütung der Eier erfolgte in einem automatisierten Brutschrank bei 37°C und 50% Humidität für mindestens 21 Tage. Nach Eröffnung des Eies und der Entnahme des Embryos, erfolgte dessen Sakrifizierung und Blutentnahme. Anschließend wurde die Leber unter Exklusion der Gallenblase entnommen, mechanisch zerkleinert und in 3 ml Williams E Medium (GIBCOBRL, Paisley, Scotland) mit 0.5% Kollagenase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) aufgenommen und für 1 h bei 37°C verdaut. Die Zellen wurden zweimal mit nativem Williams E Medium gewaschen, die vitalen und dissoziierten Zellen durch 10%ige Percoll-Dichte-Zentrifugation (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) von größeren Zellaggregaten und Zelltrümmern getrennt. Parallel wurden die entnommenen Blutseren auf die Präsenz einer natürlichen kongenitalen DHBV-Infektion mittels Protein-dot-blot-Analyse mit PreS-Antiserum getestet (Sunjach *et al.*, 1999). Hepatozyten aus DHBV-positiven Tieren wurden gepoolt und in diesem Experiment eingesetzt. Die Zellen wurden in Williams E Medium (GIBCOBRL, Paisley, Scotland), supplementiert mit 2 milliM L-Glutamin (GIBCOBRL, Paisley, Scotland), 100 Einheiten ml<sup>-1</sup> Penicillin, und 100 microg ml<sup>-1</sup> Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) 15mM HEPES (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) (pH 7.2) (alle von GIBCOBRL, Paisley, Scotland), 10<sup>-5</sup> Hydrocortison, 10<sup>-9</sup> M Insulin und 1.5% DMSO (alle von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) resuspendiert und mit einer Dichte von ca. 8x10<sup>5</sup> pro well in 12-well-Mikrotiterplatten (Greiner, Solingen, Deutschland) ausgesät und bei 37°C kultiviert. Ca. 4 h nach der Ausplattierung wurde das Medium gewechselt, und ein weiterer Mediumwechsel fand 24 h später statt. Wenn nicht anderes angegeben, wurde das Medium im folgenden alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Eine Woche nach Aussaat des Gemisches aus primären Hepatozyten und anderen Leberzellen wurde das Kulturmedium erneut gewechselt und die Zellen mit neuem Medium, welches nun unterschiedliche Konzentration an PI (10 microM, 3. microM, 1 microM, 10 nanoM, und 1 nanoM) bzw. keinen Inhibitor enthielt, inkubiert. PI wurde in PBS gelöst wie beschrieben (Adams und Stein, 1996; Adams *et al.*, 1996) und ein Aliquot der 1000-fach konzentrierten Stock-Lösung dem Medium zugesetzt. Die Morphologie der Zellen während der Behandlungsphase wurde alle 12 h (Stunden) lichtmikroskopisch überprüft. Nur bei einer Konzentration von 10 microM PI wurden die ersten, auf Toxizität deutenden morphologischen Veränderungen beobachtet. Diese traten nach etwa 48 h Behandlung auf und beinhalteten eine feingranuläre Vakuolisierung, Verlust der

makrovakuolären Fetttröpfchen sowie Abflachung der Hepatozyten, während bei nicht-parenchymalen Zellen Abrundung, Schrumpfung und die Ablösung vom Boden der Zellkulturschale das Bild bestimmte. Bei Konzentrationen kleiner als 10  $\mu\text{M}$  PI wurden selbst nach 48 h Behandlungszeit keine signifikanten morphologischen Veränderungen bei Hepatozyten beobachtet, welche auf PI-bedingte Veränderungen des Zellmetabolismus schließen lassen könnten.

Im Unterschied dazu war eine kontinuierliche Behandlung für 72 h mit 1  $\mu\text{M}$  PI nicht vereinbar mit der Vitalität der nicht-parenchymalen Zellen. Das Phasenkontrastbild (Figur 5) zeigt einen relativ großen Bereich mit einem ehemaligen Cluster von nicht-parenchymalen Zellen, wo nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  PI fast keine adhärenen Zellen mehr vorhanden sind. Die Hepatozyten haben dagegen ihre normale Morphologie beibehalten (Figur 5, Blockpfeil). Die Höchstfärbung (Figur 5) belegt, dass die restlichen nicht-parenchymalen Zellen abgerundet und pyknotisch sind (Pfeile).

Nach der Behandlung der chronisch DHBV-infizierten Hepatozyten für 48 h mit unterschiedlichen Dosen an PI (10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\text{nM}$ , und 1  $\text{nM}$ ) bzw. keinen Inhibitor wurden die Zellkulturüberstände geerntet und zentrifugiert (4000 rpm für 5 min). Die Menge der freigesetzten viralen Partikeln wurde mittels eines PreS-Antigen spezifischen dot-blot (Figur 6) und eines Immunoblots (Figur 7) bestimmt (Bruns *et al.*, 1998). Für dot-blot-Analyse wurden Aliquots von 300  $\mu\text{l}$  mittels eines Apparates (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) auf Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) aufgedotet, luftgetrocknet und anschließend mit PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Für Western blot-Analyse wurden 5  $\mu\text{l}$  Überstand nach Zugabe von SDS-PAGE Probenpuffer durch Kochen für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben in 12.5 % SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Semi-Dry Transfertechnik (Biorad, München, Deutschland) auf Nitrozellulose elektro-transferiert.

Nach Blocken mit 5% Magermilch erfolgte die Inkubation der Membranen mit PreS-spezifischem Antiserum (Kaninchen anti-preS Kpn; Fernholz *et al.*, 1993). Die markierten Proteine wurden mit enhanced Chemolumineszenzmethode (ECL) (Pierce; Rockford, USA) sichtbar gemacht. Figuren 6 und 7 zeigen, dass die Proteasom-Inhibitor-Behandlung von DHBV-infizierten Hepatozytenkulturen zu einer drastischen dosisabhängigen Verminderung an PreS-Protein im Medium führt. Selbst bei einer relativ niedrigen Konzentration von 0.01  $\mu\text{M}$  PI wurde eine fast 10-fache Inhibierung der Freisetzung der subviralen Partikel beobachtet (Figur 7). Da PreS-Protein ein struktureller Bestandteil aller viraler Partikel ist (leere subvirale Partikel und DNA-haltige infektiöse Virionen), reflektiert die PreS-Proteinmenge im dot- und Western

blot unmittelbar die Menge an umhüllten Viruspartikeln, welche während der Behandlungszeit in das Medium sezerniert wurden.

Der Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Menge der ins Medium freigesetzten, Genom enthaltenden viralen Partikel wurde mittels DNA-dot-blot analysiert (Sunjach *et al.*, 1999). Nach

der Behandlung der chronisch DHBV-infizierten Hepatozyten für 48 h mit unterschiedlichen Dosen an PI (10 microM, 3 microM, 1 microM und 10 nanoM) bzw. keinen Inhibitor wurden die Zellkulturüberstände geerntet und zentrifugiert (4,000 rpm für 5 min). Nach Aufdotten von Proben (jeweils 200 microl) auf Nitrozellulose-Membran, wurde sie mit einem alkalischen Puffer (0.5 M NaOH und 1.5 M NaCl) 2 Mal jeweils 1.5 min auf 3MM Whatman-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) denaturiert und anschließend mit einem neutralen Puffer (0.5M Tris-HCl, pH 7.4 und 3M NaCl) 4 Mal für jeweils 1 min auf 3MM Whatman renaturiert. Nach Lufttrocknung und Crosslinking der Membran erfolgte anschließend deren Hybridisierung mit <sup>32</sup>P-markiertem kloniertem DHBV-Genom als Sonde. Die Signale wurden durch Autoradiographie nach einem Standardprotokoll (Sunjach *et al.*, 1999) sichtbar gemacht.

Die Figur 8 zeigt, dass PI die Menge der freigesetzten kompletten Viruspartikel mindestens um den Faktor von ca. 4 reduziert. Das Ergebnis der DNA-Bestimmung korreliert somit mit der in ähnlicher Weise reduzierten Menge an sezerniertem PreS-Antigen (Figur 6 und 7).

Um den Einfluss der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren auf die intrazelluläre DHBV-Expression zu testen, wurden die parallel behandelten und unbehandelten Zellen mit 200 microl

Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Natrium-Deoxycholat), komplementiert mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete, Roche, Mannheim) lysiert.

Die Lysate wurden von der unlöslichen Zellfraktion durch Zentrifugation (14,000 rpm, 10 min, 4°C) getrennt, und jeweils 20 microl der geklärten Gesamtllysate wurden nach Zugabe von Laemmli-Puffer durch Kochen für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben in 12.5 %

SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Semi-Dry Transfertechnik (Biorad, München, Deutschland) auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit 5% Magermilch (Biorad, München, Deutschland) geblockt und nach Waschen mit TBS (tris buffered saline) mit Antikörpern gegen PreS- (Fernholz *et al.*, 1993) oder gegen Core-Protein (Breiner *et al.*, 2001) inkubiert (Figur 9 und 10). Die markierten viralen Proteine wurden anschließend mittels enhanced

Chemolumineszenz (Pierce, Rockford, USA) sichtbar gemacht.

Die Figuren 9 und 10 zeigen, dass es unter Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zu keiner signifikanten Änderung der steady state Mengen an intrazellulärem PreS- (Figur 9) und Core-Protein (Figur 10) kommt. Lediglich bei der höchsten Konzentration von 10 microM PI ist eine geringfügige Reduktion an viralen Proteinen zu beobachten. Es ist bemerkenswert, dass zum

Beispiel 10 nanoM PI überhaupt keinen Effekt auf die intrazelluläre virale Proteinexpression hat, aber immer noch einen deutlichen Effekt auf die Freisetzung ausübt.

In der Summe dieser Ergebnisse wird festgestellt, dass die Behandlung von chronisch infizierten primären Entenhepatozyten mit PI bis zu einer Konzentration von 10 microM über einen 48 h  
5 Behandlungszeitraum nur einen geringen oder gar keinen Einfluss auf die intrazelluläre Expression von Core- und PreS-Antigen hat, während die Freisetzung von viralen Partikeln jedoch drastisch reduziert ist. Darüber hinaus kann geschlussfolgert werden, dass Vitalität und Proteinsynthese der primären Entenhepatozyten nicht wesentlich beeinträchtigt sind.

Um die Wirksamkeit der Behandlung von primären Entenhepatozyten mit Proteasom-Inhibitoren  
10 hinsichtlich der Blockade des UPS zu demonstrieren, wurden jeweils 20 microl der Zelllysate in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen, für 5 min gekocht, und in 6% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und mit polyklonalen Kaninchen-anti-Ubiquitin-Antikörpern (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert und mittels nachfolgender ECL-Reaktion sichtbar gemacht. Die Figur 11 zeigt ab einer Konzentration von 1 microM PI  
15 eine deutliche Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen relativ zu den niedermolekularen Banden. Es ist bekannt, dass lang andauernde Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zu einer Veränderung sowohl der Proteinsynthese als auch des -musters führt. Diese ist deutlich anhand des veränderten Profils der niedermolekularen Proteine in den PI-behandelten Zellen zu erkennen und daher ein weiterer Beleg für die Wirksamkeit von PI zur  
20 effizienten Blockierung der Proteasom-Aktivität in primären Hepatozyten.

**Beispiel 8: Proteasom-Inhibitoren blockieren die Produktion / Freisetzung von infektiösen Viren aus chronisch DHBV-infizierten primären Hepatozyten.**

In den vorhergehenden Experimenten (Beispiel 7) wurde festgestellt, dass eine Inhibition der  
25 zellulären Proteasom-Aktivität die Freisetzung von DHBV-Proteinen wesentlich einschränkt, ohne jedoch signifikant die intrazelluläre virale Proteinexpression zu beeinflussen. Es blieb daher weiterhin zu klären, ob die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Sekretion von Viruspartikeln um einen Faktor von ca. 4 reduziert, sondern darüber hinaus auch noch einen negativen Effekt auf den Grad der Infektiosität der Nachkommenviren hat. Es wurde daher  
30 untersucht, ob und wie viele infektiöse Virionen in den Überständen von mit Proteasom-Inhibitoren behandelten chronisch DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten enthalten sind im Vergleich zu nicht behandelten Zellen. Hierzu wurden ca. 7 Tage alte, chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozyten, deren Herstellung bereits unter Beispiel 7 beschrieben ist, für 48 h mit 10 microM PI behandelt. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände, wie

bereits unter Beispiel 7 beschrieben, geerntet und für die Neuinfektion von primären Leberzellen benutzt. DHBV-negative, primäre Entenhepatozyten wurden wie im Beispiel 7 beschrieben präpariert und mit einer Dichte von ca.  $8 \times 10^5$ /well in 12 well-Mikrotiterplatten ausgesät. Eine Woche nach der Ausplattierung wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml zellfreier Zellkulturüberstände von PI-behandelten beziehungsweise nicht behandelten DHBV-positiven Zellkulturen infiziert. Als Kontrolle wurde eine parallele Kultur mit 20 microl DHBV-positivem Serum/well infiziert (entspricht einer multiplicity of infection (MOI) von 20). Nach 16 h Inkubation bei 37°C wurde das Virus-Inokkulum entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Medium weiterkultiviert. Die Etablierung einer produktiven Infektion wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz und SDS-PAGE für die viralen Proteine Core und PreS nach 2.5 Tagen bestimmt. Für Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml einer eiskalten 1:1 Mischung aus Methanol und Aceton für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit dem ersten Antikörper, Kaninchen-anti-PreS (Breiner *et al.*, 2001) in einer Verdünnung von 1:800 in PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Die Zellkerne wurden mit Hoechst (4 microg/ml) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. Die Fluoreszenzen wurden mit einem inversen Epifluoreszenzmikroskop (Axiovert S100, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) analysiert und mittels des Bildverarbeitungssystems Openlab (Improvision, Coventry, UK) prozessiert. Die Immunfluoreszenzbilder zeigen, dass in Zellkulturen, welche mit DHBV aus Zellkulturüberständen von mit PI-behandelten Zellen infiziert wurden, keine PreS-exprimierende Zelle nachgewiesen werden konnte (Figur 12, PreS), während ca. 1-5% der Hepatozyten in den Kulturen, welche mit Überständen von unbehandelten Zellen inkubiert wurden, eindeutig PreS-positiv und damit infiziert waren (Figur 13, PreS). Als Nachweis für die Anzahl der auf dem Objektträger vorhandenen Zellen wurde deren Zellkerne mit Hoechst gefärbt und dieses Bild mit dem Fluoreszenzbildern überlagert (für behandelte Zellen, siehe Figur 12 und für unbehandelte Zellen, siehe Figur 13, jeweils Hoechst und PreS merge).

Für Western blot-Analysen wurden die Zellen aus parallelen Kulturen direkt mit 200 microl Laemmli-Puffer lysiert und für 5 min gekocht. Jeweils 20 µl der Zelllysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen PreS- (Fernholz *et al.*, 1993) oder gegen Core-Protein (Breiner *et al.*, 2001) inkubiert und Proteine mit ECL sichtbar gemacht. Die blots zeigen deutlich sichtbare Signale für



PreS- (Figur 14, Spur 3) und Core-Protein (Figur 15, Spur 3) in den Extrakten von Zellen, die mit DHBV aus nicht behandelten Zellen infiziert wurden, dagegen so gut wie keinen Hinweis für die Expression von DHBV-Proteinen in Zellen, welche mit Zellkultur-Überständen von PI behandelten Zellen inkubiert wurden (Figur 14, Spur 4 bzw. Figur 15, Spur 4).

5

**Beispiel 9: Proteasom-Inhibitoren blockieren sowohl die frühe Phase einer akuten DHBV-Infektion als auch die nachfolgende Sekundärinfektion und damit deren Ausbreitung in Zellkultur.**

In den vorhergehenden Ausführungsbeispielen wurde gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Sekretion neuer viraler und subviraler Partikel aus chronisch DHBV-infizierten Hepatozyten hemmen, sondern darüber hinaus auch die Infektiosität der wenigen, noch freigesetzten DHB-Virionen praktisch vollkommen blockieren. Daher kann angenommen werden, dass Proteasom-Inhibitoren die Ausbreitung einer bereits etablierten Infektion (durch freigesetzte Nachkommensviren aus bereits infizierten Hepatozyten) auf nicht infizierte Zellen, die so genannte Sekundärinfektion, verhindern kann. Dieser Effekt wurde in folgendem Experiment untersucht: Primäre Hepatozyten aus DHBV-negativen Tieren wurden exakt nach der im Beispiel 7 beschriebenen Methodik präpariert. 4 Tage nach Aussaat der Zellen in 12 well-Mikrotiterplatten (ca.  $8 \times 10^5$  Zellen/well) wurde das Kulturmedium erneut gewechselt und die Zellen mit einer MOI von 20 infiziert. Nach 16 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in neuem Medium für weitere 3 Tage weiter kultiviert. In diesem Zeitraum findet nur die Etablierung der Primärinfektion statt. Danach wurde das Medium erneut gewechselt, und zu parallelen Kulturen wurden jeweils 1  $\mu$ M der Proteasom-Inhibitoren Eponemycin oder Expoxomicin zugegeben, und die Kulturen für weitere 3 Tage inkubiert. Entsprechend des oben beschriebenen Effektes von Proteasom-Inhibitoren sollten die behandelten primär infizierten Zellen im Vergleich zu nicht behandelten Zellen sowohl eine geringere Expression der viralen Antigene zeigen als auch (wegen der Blockade der Sekundärinfektion) die Zahl der infizierten Zellen deutlich verringert sein. Um dies zu prüfen, wurden die Zellkulturen fixiert und die Zahl der Core-positiven Zellen und deren Expressionshöhe auf Einzelzellebene durch indirekte Immunfluoreszenz mit anti-Core Antikörpern bestimmt. In der Tat hemmen die eingesetzten Proteasom-Inhibitoren sowohl die Erhaltung einer bereits etablierten, produktiven Infektion (offensichtlich in der Figur 16 (Core, PI, Epone- und Epoxomicin), welches an der sehr viel geringeren Anzahl von Core-positiven Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (Figur 16, unbehandelt) ablesbar ist. Zum

Vergleich sind die Phasenkontrastaufnahmen (Figur 16, Phako) als auch die Hoechstfärbung (Figur 16, Hoechst) der gleichen Bildausschnitte gezeigt.

Um herauszufinden, ob Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung des sogenannten e-Antigens, welches für die Etablierung einer chronischen Infektion notwendig ist (Chen *et al.*, 1992), hemmen, wurde die Menge des e-Antigens im Medium mittels Immunoblot bestimmt und mit dem ebenfalls getesteten PreS-Antigen korreliert. Hierzu wurden die Proteine von je einem Aliquot der Zellkulturmedien (20 microl) in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und die e- und PreS-Antigenproteine durch Kaninchenantikörper gegen Core-Protein (kreuzreagierend mit dem e-Antigen, Breiner *et al.*, 2001) bzw. PreS durch ECL nachgewiesen. Wie in Figur 17 und 18 zu sehen, führt die Proteasom-Inhibitor-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der Menge des e- bzw. des PreS-Antigens im Medium. Die Coomassieblaufärbung der Gele ergab, dass die Proteasom-Inhibitoren spezifisch nur die Sekretion der getesteten viralen Proteine hemmen, jedoch nicht die bestimmter zellulärer Proteine.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren zu einer drastischen Reduktion der Freisetzung des e- und PreS-Antigens führt.

Um zu zeigen, dass die geringere Zahl DHBV-positiver Zellen in den mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Zellen in der Tat durch Blockade der Sekundärinfektion bedingt ist, wurden die Zellen drei Tage nach Infektion für drei Tage mit 100 microg/ml Suramin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) behandelt. Suramin, eine *in vivo* sehr toxische Substanz, blockiert bekanntlich die Sekundärinfektion, ohne dabei mit der bereits etablierten primären DHBV-Infektion zu interferieren (Pugh und Simmons, 1994). Andererseits sind die mit Suramin vorbehandelten Hepatozyten resistent gegenüber einer DHBV-Infektion. Dementsprechend ergibt sich drei Tage nach der Primärinfektion in den mit Suramin behandelten Zellen (Figur 19, Suramin 3 d post Infektion) eine ähnlich intensive Core-Färbung von Zellen wie in den unbehandelten Kulturen (Figur 19, unbehandelt), jedoch ist die Zahl der Core-exprimierenden Zellen sehr stark verringert. Die Vorbehandlung der Zellen mit Suramin blockiert wie erwartet die Etablierung der primären Infektion vollständig (Figur 19, Suramin 2 h prä Infektion). Die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (Figur 19, Phako) und Höchstfärbungen (Figur 19, Höchst) der gleichen Bildausschnitte sind zum Vergleich ebenfalls gezeigt.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass Proteasom-Inhibitoren, ähnlich wie Suramin, durch Blockade der Sekundärinfektion die Ausbreitung der DHBV-Infektion verhindern können. Darüber hinaus und im Gegensatz zu Suramin führt die Hemmung der Proteasom-Aktivität

additiv zu einer Reduktion der viralen Genexpression in primär infizierten Hepatozyten. Die Effekte von Proteasom-Inhibitoren sowohl auf die Primär- als auch auf die Sekundärinfektion korrelieren eng mit dem Potential der eingesetzten unterschiedlichen Substanzklassen.

Insgesamt demonstrieren diese Experimente, dass Proteasom-Inhibitoren sowohl die Etablierung als auch die Persistenz einer primären Infektion hemmen. Darüber hinaus verhindern sie die Ausbreitung der primären DHBV-Infektion durch Blockierung der Nachkommenviren. Damit sind Proteasom-Inhibitoren geeignete Substanzen, um die Ausbreitung einer HBV-Infektion *in vivo* zu blockieren.

10 **Beispiel 10: Proteasom-Inhibitoren induzieren Hypophosphorylierung des Core-Proteins in chronisch DHBV-infizierten primären Hepatozyten.**

In den vorhergehenden Ausführungsbeispielen wurde gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren nicht nur die Sekretion neuer viraler und subviraler Partikel aus Hepatozyten hemmen, sondern darüber hinaus auch die Infektiosität der wenigen, noch freigesetzten DHB-Virionen praktisch 15 vollkommen blockieren. Ein Grund für die massiv reduzierte Infektiosität von DHBV könnte auf die Proteasom-Inhibitor-vermittelten posttranslationalen Modifikationen der strukturellen Komponenten des Virus beruhen. Zum Beispiel würde eine Änderung des Phosphorylierungsgrades des Core-Proteins zu einem Defekt in der Destabilisierung der "incoming Cores" in der frühen Phase der Infektion führen.

20 Um den Einfluss der Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren auf das intrazelluläre Phosphorylierungsmuster des Core-Proteins zu testen, wurden ca. 7 Tage alte, chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozyten für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI 10 µM, 3 µM, 1 µM und 10 nM behandelt. Abschließend wurden die Zellen lysiert (50 mM Tris.HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Natrium-Deoxycholat, komplementiert mit einem 25 Protease-Inhibitor-Cocktail) (Complete, Roche, Mannheim)). Die Zelllysate wurden von der unlöslichen Fraktion durch Zentrifugation (14,000 rpm, 10 min, 4°C) getrennt und jeweils 20 µl der geklärten Fraktion wurden nach Zugabe von Laemmli-Puffer durch Kochen für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Lysate in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Semi-Dry Transfertechnik (Biorad, München, Deutschland) auf Nitrozellulose elektro- 30 transferiert. Die Membranen wurden mit 5% Magermilch geblockt und nach Waschen mit TBS mit Antikörpern gegen Core-Protein (Breiner *et al.*, 2001) inkubiert (Figur 20). Die markierten viralen Proteine wurden anschließend mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Die Figur 20 zeigt, dass in allen behandelten Proben das Verhältnis von hyperphosphoryliertem Core- zu weniger oder nicht phosphoryliertem Core-Protein zugunsten des letzteren verschoben ist. Es ist

bemerkenswert, dass zum Beispiel 10 nanoM PI überhaupt keinen Effekt auf die intrazelluläre virale Proteinexpression hat (Figur 9, Spur 6; Figur 10, Spur 6), aber immer noch einen deutlichen Effekt auf den Phosphorylierungsgrad des Core-Proteins (Figur 20, Spur 6) ausübt.

Im Ergebnis dieser Untersuchung wird daher festgestellt, dass Proteasom-Inhibitoren zu einer Veränderung in der Modifizierung des Nukleokapsidproteins führen und dies wahrscheinlich die mechanistische Grundlage für die reduzierte Infektiosität der aus den mit Proteasom-Inhibitoren behandelten Zellen sekretierten DHB-Viren ist.

**Beispiel 11: Primäre Entenhepatozyten sind relativ resistent gegenüber den toxischen Effekten von Proteasom-Inhibitoren.**

Da das UPS in zahlreichen zellulären Mechanismen involviert ist, ist eine vollständige Inhibition der Proteasom-Aktivität auf längere Zeit nicht mit der Vitalität einer Zelle vereinbar. Jedoch zeigen verschiedene Zelltypen unterschiedliche Sensitivität gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren. Dabei ist auffällig, dass sich rasch teilende und/oder aktivierte Zellen in der Regel eine höhere Sensitivität gegenüber Proteasom-Inhibitoren besitzen im Vergleich zu ruhenden und/oder nicht aktivierten Kulturen. Darauf beruht die anti-neoplastische Wirkung der Proteasom-Inhibitoren. Um die Toxizität von Proteasom-Inhibitoren in primären Entenhepatozyten im Vergleich zu humanen transformierten Hepatoblastoma-Zellen zu bestimmen (siehe Beispiel 12), wurden Dosis-Limitierungsstudien mit Proteasom-Inhibitoren durchgeführt. Hierzu wurden primäre Hepatozyten, wie im Beispiel 7 bereits beschrieben, aus Entenembryonen gewonnen, mit einer Dichte von ca.  $8 \times 10^5$ /well in 12 Well-Mikrotiterplatten ausgesät und für 7 Tage kultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde lichtmikroskopisch überprüft. Parallel Kulturen wurden mit steigenden Dosen an PI (jeweils 10 microM, 3 microM, 1 microM, 10 nanoM und 1 nanoM) für 48 h behandelt. Etwa alle 12 h wurden die Zellen hinsichtlich Morphologie und Vitalität lichtmikroskopisch untersucht. Zusätzlich wurde deren Funktionalität mittels Fluoreszenzvitalfärbung mit Fluoreszeindiazetat (FDA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bestimmt (Yagi *et al.*, 2001). FDA wird aktiv und präferenziell von Hepatozyten aufgenommen und dort mittels einer Lipase, die exklusiv in Hepatozyten exprimiert wird, in Fluoreszein konvertiert und bewirkt die Fluoreszenzfärbung des Zytoplasmas, ein Zeichen für die Funktionsfähigkeit und Vitalität von Hepatozyten. In diesem Experiment wurden die behandelten und unbehandelten primären Entenhepatozyten mit FDA-haltigem Williams E Medium (5 microg/ml) für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die Vitalität der Hepatozyten mittels eines inversen Epifluoreszenzmikroskops beurteilt und mit dem Bildverarbeitungssystem Openlab weiter prozessiert. Figur 21 zeigt, dass

alle Kulturen, die mit bis zu 1  $\mu\text{M}$  PI behandelt wurden, weder eine morphologische Veränderung noch Hinweise auf eingeschränkte Vitalität zeigten, d.h. nicht zu unterscheiden waren von nicht behandelten Hepatozyten (Figur 22). Bei Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  der PI wurden in den Nicht-Hepatozyten, die in Kulturen von primären Hepatozyten  
5 immer mit vorliegen, deutliche morphologische Veränderungen wie zum Beispiel abgerundete Zellen und intrazelluläre Vakuolenbildung beobachtet. Die Vitalität der Hepatozyten dagegen war nicht verändert gemäß visueller Beurteilung und der Fluoreszenzintensität. Erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  PI traten erste Zeichen einer toxischen Wirkung auch in Hepatozyten auf (Figur 21). Ähnliche Ergebnisse wurden mit unterschiedlichen PI, wie zum  
10 Beispiel Lactazystin und Epoxomicin, beobachtet.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass primäre Entenhepatozyten relativ hohe Konzentrationen von bis zu ca. 10  $\mu\text{M}$  Proteasom-Inhibitor tolerieren können, während proliferierende Leberkarzinomzellen (siehe Beispiel 12) und andere proliferierende Zellen in der Hepatozyten-Kultur sehr viel sensitiver gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-  
15 Inhibitoren sind (Figur 5, 21, 23, 24 und 25).

#### **Beispiel 12: Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf das Zellwachstum und die Vitalität der humanen Hepatoma-Zellen, HepG2.**

Die humane Hepatoma-Zelllinie HepG2 wurde in Dulbeccos' modifizierten Eagle's Medium  
20 (DMEM) (GIBCOBRL, Paisley, Scotland) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (Biochrom, Berlin, Deutschland), 2  $\text{mM}$  L-Glutamin (GIBCOBRL, Paisley, Scotland), 100 Einheiten  $\text{ml}^{-1}$  Penicillin und 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) bei 37°C kultiviert. Nach Passagierung mit 0.25% Trypsin und 1  $\text{mM}$  EDTA (GIBCOBRL, Paisley, Scotland) wurden die Zellen in einer Dichte von  $0.5 \times 10^6$  /well in 12 well-  
25 Mikrotiterplatten ausgesät. 24 h später wurde das Medium gewechselt, und die Zellen wurden mit PI, Eponemycin und Epoxomicin, jeweils in Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  sowie 100  $\text{nM}$ , 10  $\text{nM}$ , und 1  $\text{nM}$  für 48 h behandelt und anschließend mit Trypanblaufärbung auf ihre Vitalität getestet und mittels Lichtmikroskopie morphologisch begutachtet. Bis zu einer Konzentration von 10  $\text{nM}$  war keiner der eingesetzten Proteasom-  
30 Inhibitoren toxisch und anti-proliferativ (Figur 23, 24 und 25). Toxische Erscheinungen traten ab einer Konzentration von 100  $\text{nM}$  bei PI (Figur 23) und Epoxo- (Figur 25) auf, während Eponemycin (Figur 24) noch gut vertragen wurde. Bei 1  $\mu\text{M}$  und höher waren alle getesteten Substanzen hochtoxisch (Figur 23, 24 und 25). Dabei wurden Effekte wie Abrundung und Ablösung der Zellen, Degeneration sowie Apoptose beobachtet.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass proliferierende Leberkarzinoma-Zellen sehr viel sensitiver gegenüber der toxischen Wirkung von Proteasom-Inhibitoren sind, während primäre Entenhepatozyten relativ hohe Konzentrationen von bis zu ca. 10 microM Proteasom-Inhibitoren tolerieren können (Figur 21, 23, 24 und 25).

**Beispiel 13: Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die Sekretion von HBV-spezifischen Antigenen in humanen Hepatoma-Zelllinien.**

Primäre humane Hepatozyten wurden wie beschrieben aus menschlichen Lebern gewonnen (Dandri *et al.*, 2001) und mit humanem HBV infiziert, welche aus dem Medium von HepG2.2.15-Zellen, die infektiöses humanes Hepatitis-B-Virus produziert (Sells *et al.*, 1987), geerntet wurden. Parallele Kulturen der HepG2-Zellen wurden für zwei Tage mit PI behandelt, oder nicht behandelt. Die HepG2-Zellen wurden vor der Behandlung mit replikationskompetenten HBV-Genomen wie beschrieben (Kalinina *et al.*, 2001) transfiziert. Im Gegensatz zu zahlreichen HBV Core-positiven primären Hepatozyten (analysiert durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit anti-Core Antikörpern), welche auf eine erfolgreiche Infektion von primären humanen Hepatozyten mit Viren aus den nicht behandelten Zellen schließen lassen, wurde keine Core-positive primäre humane Hepatozyten nach Infektion mit Nachkommenviren aus Proteasom-Inhibitor-behandelten HepG2 Zellen gefunden. Im Ergebnis dieses Experimentes kann damit festgestellt werden, dass Proteasom-Inhibitor-Behandlung ähnlich der Wirkung auf DHBV ebenfalls die Freisetzung und Infektiosität von HBV blockiert.

Generell beinhalten späte Prozesse des Replikationszyklus die Neusynthese von viralen Strukturproteinen in der infizierten Zelle, die korrekte Faltung und Modifizierung sowie den Transport der Strukturprotein zu dem Ort der Virusassemblierung, gefolgt von Virusfreisetzung an der Zellmembran und der proteolytischen Prozessierung der Gag-Polyproteine im reifenden Viruspartikel durch die virale Protease. Am Beispiel der Humanen Immundefizienzviren wie auch an Hepatitis-B-Viren wurde gezeigt, dass die verschiedenen Inhibitoren des 26S Proteasoms sowohl die Freisetzung von Viruspartikeln als auch die Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel reduzieren. Die biochemischen Untersuchungen zeigen, dass Proteasom-Inhibitoren spezifisch die Reifung und proteolytische Prozessierung der Gag-Proteine blockieren und bei Hepatitis-B-Viren auch die posttranslationale Modifikation des Nukleokapsids ändern und die Sekretion des e-Antigens reduzieren. Morphologische Untersuchungen zeigen, dass sich im Falle von HIV-1 in Gegenwart von Proteasom-Inhibitoren unreife Viruspartikel an der Zellmembran konzentrieren. Virologische Untersuchungen zeigen, dass Proteasom-Inhibitoren die Ausbreitung einer HIV-1-Infektion wie auch eine HBV-Infektion in der Zellkultur

verhindern. Mechanistische Untersuchungen zeigen weiterhin, dass Proteasom-Inhibitoren keinen direkten Effekt auf die virale Protease von HIV-1 ausüben, sondern zelluläre Mechanismen beeinflussen, welche für die effiziente Reifung und Freisetzung von Viruspartikeln notwendig sind.

5 Die Verwendung von Proteasom-Inhibitoren stellt eine neuartige Methode zur Intervention viraler Replikationszyklen dar. Da das Target dieser Methode konservierte zelluläre Mechanismen, dass heißt die enzymatische Aktivität des Proteasom-Komplexes selbst darstellt, sind bei einer *in vivo* Applikation von Proteasom-Inhibitoren keine durch virale Mutationen vermittelte Resistenzmechanismen zu erwarten.

10 Die Erfindung betrifft des weiteren die Verwendung in der Grundlagenforschung, z.B. die Analyse der Assemblierung, Freisetzung und Reifung von Retroviren, speziell späte Prozesse im HIV-Replikationszyklus; ferner

- die Grundlagenforschung und angewandten Forschung,
- das Verständnis der Retrovirusassemblierung,

15 - das Verständnis der Wirkungsweise der viralen Proteasen,

- das Verständnis der Gag-Prozessierung von Retroviren,
- das Verständnis zellulärer Mechanismen, involviert in den späten Prozess der Retrovirus-Assemblierung, insbesondere von Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems, von Ubiquitin-bindenden Faktoren,

20 - Faktoren, welche an ubiquitinierte Gag-Proteine von Retroviren binden,

- Faktoren, welche an mono-ubiquitinierte L (late assembly)-Domänen von retroviralen Gag-Proteinen binden,

- zelluläre Faktoren, welche die mono-Ubiquitinierung von L-Domänen von Retroviren steuern, regulieren, beeinflussen und / oder hemmen,

25 - zelluläre Faktoren, welche die mono-Ubiquitinierung von L-Domänen in Gag-Proteinen von Retroviren durch De-Ubiquitinierung rückgängig machen,

- zelluläre Faktoren, welche späte Prozesse der Virusassemblierung, speziell der Ablösung von Viruspartikeln von der Zellmembran in Abhängigkeit der mono-Ubiquitinierung von L-Domänen in retroviralen Gag-Proteinen steuern, regulieren, beeinflussen und / oder hemmen

30 sowie

- das Verständnis bei der Entwicklung von weiteren Substanzen, welche die retrovirale Gag-Prozessierung sowie die Assemblierung und die Freisetzung von Retroviren durch Beeinflussung der Wechselwirkung von retroviralen Gag-Proteinen mit dem Ubiquitin-Proteasom-System steuern, regulieren, beeinflussen und / oder hemmen können.

Weitere Anwendungsgebiete der vorliegenden Erfindung sind:

- die Vorbeugung und Behandlung/Therapie von Erkrankungen, die durch Retrovirusinfektion verursacht werden, speziell die anti-retrovirale Therapie und Vorbeugung bei Infektionen mit Immundefizienz verursachenden Lentiviren, vor allem die erworbene Immundefizienz bei Tieren und Menschen, wie die Behandlung von HIV-infizierten Individuen - symptomloser wie auch AIDS-Patienten, die Vorbeugung einer HIV-Infektion und die Verhinderung einer HIV-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit HI-Viren;
- die Entwicklung von neuen Pharmaka, speziell auf der Basis von Substanzen, die das 26S Proteasom inhibieren, wie Proteasom-Inhibitoren, die *in vivo* applizierbar sind und eine geringe Toxizität aufweisen und dabei gleichzeitig die Replikation von Retroviren im Organismus unterdrücken und die Infektionsausbreitung verhindern;
- die Applikation von retroviralen Vektoren für den Einsatz bei Gentransfermethoden in der Gentherapie, speziell der Anwendung von Proteasom-Inhibitoren zur Verhinderung der Entstehung und Ausbreitung rekombinanter und/oder ungewollter replikationskompetenter Retroviren nach Gentransfer;
- die Virologie, Zellbiologie, Gentherapie, Pharmakologie, Naturstoffchemie, Peptidchemie, molekulare HIV- und angewandte AIDS-Forschung.

## 20 Legende zu den Figuren

### Figur 1: Elektronenmikroskopische Analyse HIV-1 infizierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Behandlung mit PI.

MT-4-Zellen wurden mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert und zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 4 Tage post infectionem) mit 50 µM zLLL für 5 Stunden behandelt. Zellen wurde in Zellulose-Kapillaren fixiert und für Dünnschnitt-Mikroskopie präpariert. In Panel "verschiedene Buddingstrukturen" ist ein Überblick von infizierten Zellen mit Virus-Buddingstrukturen von reifen und unreifen Viren dargestellt. Panel "reife extrazelluläre Virionen" zeigt reife extrazelluläre HIV-1 Partikel, und Panel "arrestierter budding Virus" zeigt eine hoch auflösende Vergrößerung von unreifen Partikeln, welche noch mit der Zellmembran verbunden sind.

### Figur 2: Proteasom-Inhibitoren hemmen Gag-Prozessierung und Virusfreisetzung von HIV-1 und HIV-2 in infizierten und transfizierten Zellen.



(A) HeLa-Zellen wurden mit dem HIV-1 proviralen infektiösen DNA-Klon pNL4-3 transfiziert. Nach 24 Stunden wurden parallele Ansätze der transfizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren (10 microM zLLL und 10 microM LC (+INHIBITOREN)) im Medium oder ohne Inhibitoren (NO INHIBITOR) behandelt und einem pulse/chase-Experiment unterzogen. Radioaktiv mit  $[^{35}\text{S}]$ -Methionin markierte virale Proteine wurden mittels Immunpräzipitation aus der zellulären Fraktion (ZELLE), der pelletierten Virus-Fraktion (VIRUS) sowie der nach Zentrifugation erhaltenen Virus-freien Überstand-Fraktion (FREIES PROTEIN) isoliert und in einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Proteine wurden anschließend durch Fluorographie sichtbar gemacht. Die relative Konzentration dieser Proteine wurde mittels Image-Analyse quantitativ ausgewertet. Repräsentative Ausschnitte der Fluorogramme im Molekulargewichtsbereich von CA und Gag-Polypeptid Pr55 (ca. 20 bis 60 kDa) sind in Panel "HIV-1 in HeLa" dargestellt. Positionen von dem Hauptprozessierungsprodukt  $p24^{\text{CA}}$  sowie einem intermediären Spaltprodukt,  $p25^{\text{CA}}$ , sind extra markiert. Die Kinetik der Virusfreisetzung wurde als der prozentuale Anteil von Gag-Proteinen in der Virus-Fraktion relativ zu der Gesamtmenge an Gag (in ZELL, VIRUS, und FREIES PROTEIN) pro Zeitpunkt des chases dargestellt. Die Kinetik der intrazellulären Gag-Prozessierung wurde als der Quotient der Mengen von CA durch Pr55 über den gesamten chase-Zeitraum dargestellt. Es tritt eine deutliche, ca. 6-fache Verzögerung in der Gag-Prozessierung sowie der Virusfreisetzung innerhalb des 8-stündigen chase-Zeitraumes auf. Ebenfalls ist deutlich die Akkumulation unvollständiger Spaltprodukte, wie zum Beispiel von  $p25^{\text{CA}}$ , in den ZELL- und den Virus-Fraktionen zu erkennen. In den pulse/chase-Experimenten zu dem Panel "HIV-1 in A3.O1" wurden  $\text{CD4}^+$  T-Zellen mit HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert, und die Infektionsausbreitung in der Kultur wurde durch Bestimmung der RT-Aktivität im Zellkulturüberstand verfolgt. Zum Zeitpunkt der maximalen Virusreplikation, ca. 7 Tage nach der Infektion, wurden parallele Ansätze der Kultur mit Proteasom-Inhibitor (10 microM zLLL (+INHIBITOR)) im Medium oder ohne Inhibitor (NO INHIBITOR) behandelt und einem pulse/chase-Experiment gefolgt von Immunpräzipitation und SDS-PAGE unterzogen, ähnlich dem in Fig. 2, Panel "HIV-1 in HeLa" dargestellten Experiment. Die Positionen der Hauptstrukturproteine von Env (gp160 und gp120) sowie von Gag (Pr55 und CA) sind in den Fluorogrammen der jeweiligen SDS-PAGE-Analysen angezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass selbst bei einer vergleichsweise niedrigen Konzentration von 10 microM zLLL eine deutliche Verzögerung der Kinetik der intrazellulären Gag-Prozessierung sowie der Freisetzung von Virus-assoziiertem und freiem Gag auftritt. Gleichzeitig tritt eine Akkumulation von intermediären Prozessierungsprodukten im Bereich von ca. 40 kDa auf, insbesondere in der VIRUS-Fraktion.

In dem pulse/chase-Experiment zu der Figur 2, Panel "HIV-2 in HeLa", wurden HeLa-Zellen mit dem HIV-2 proviralen infektiösen DNA-Klon pHIV-2<sub>ROD10</sub> transfiziert. Nach 24 Stunden wurden parallele Ansätze der transfizierten Zellen mit Proteasom-Inhibitoren (10 microM zLLL und 10 microM LC (+INHIBITOREN)) im Medium oder ohne Inhibitoren (NO INHIBITOR) behandelt, und einem pulse/chase-Experiment gefolgt von Immunpräzipitation und SDS-PAGE unterzogen, ähnlich dem vorher in Figur 1 dargestellten Experiment. Repräsentative Ausschnitte der Fluorogramme im Molekulargewichtsbereich von CA und Gag-Polypeptid Pr55 (ca. 20 bis 60 kDa) der ZELL- und VIRUS-Fractionen sind in Fig. 2, Panel "HIV-2 in HeLa", dargestellt. Positionen der Hauptprozessierungsprodukte p27<sup>CA</sup> und dem Gag-Polypeptid Pr58 sind angezeigt. Eine starke Reduktion der intrazellulären und Virus-assoziierten Gag-Prozessierung sowie eine deutliche Reduktion der Virusfreisetzung ist zu beobachten.

**Figur 3: Proteasom-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf Gag-Prozessierung von Pr55 durch virale Protease *in vitro*.**

Rekombinantes Pr55 wurde aus Virus-ähnlichen Partikeln isoliert, welche von Insektenzellen infiziert mit rekombinanten Baculovirus produziert wurden. Rekombinante HIV-1 Protease wurde in *E. coli* exprimiert, gereinigt und die spezifische Aktivität durch aktive-site-Titration bestimmt. Die Mengen an Pr55 und Protease wurde in einem Enzyme-zu-Substrat-Verhältnis von 1:25 gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Probepuffer gestoppt. Die Spalt-Reaktionen wurden anschließend durch Western blot-Analyse mit CA-spezifischem Antiserum untersucht. Pr55, CA und intermediäres Prozessierungsprodukt MA-CA wurden nach Antikörperbindung mittels Chemilumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht. In den Reaktionen 3 bis 10 wurde die Protease vor Beginn der Spaltreaktion mit den jeweiligen Proteasom-Inhibitoren 5 min vor Zugabe des Substrates Pr55 vorinkubiert. In Reaktion 10 wurde der HIV-1 Protease spezifische Inhibitor Saquinavir zugegeben.

**Figur 4: Proteasom-Inhibitoren hemmen HIV-1 Replikation in Zellkultur.**

Parallele Kulturen von A3.01-Zellen wurden mit vergleichbaren infektiösen Dosen an HIV-1<sub>NL4-3</sub> infiziert und mit 5 µM (Panels "1. und 2. Experiment in A3.01") behandelt. In einem parallelen Versuch wurden Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen an zLLL (0.1 und 1 µM, Panel "3. Experiment in A3.01") sowie Epoxomicin (10 nM bis 1 µM, Panel "4. Experiment in A3.01") behandelt. Die Sekretion von reverser Transkriptaseaktivität in das Zellkulturmedium wurde im Verlauf des Virus-Replikationsprofils (ca. 2 Wochen Kultur) dargestellt.

**Figur 5: Nichtparenchymale Zellen einer primären Hepatozytenkultur sind sensitiver gegenüber den toxischen Effekten von Proteasom-Inhibitoren.**

Gezeigt ist eine primäre Hepatozytenkultur, welche mit 1 microM PI für 72 h behandelt worden ist. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Kerne mit Hoechst gefärbt (blau). Die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme ist gegenübergestellt. Das obere Phasenkontrastbild zeigt eine ehemalige Insel aus Nicht-Hepatozyten, während das untere die gefärbten Kerne desselben Bildausschnittes wiedergibt. Die kleinen Pfeile zeigen auf die apoptotischen nicht-parenchymalen Zellen, während der Blockpfeil auf eine intakte, kleine Hepatozytenkolonie zeigt.

**Figur 6: Proteasom-Inhibitoren hemmen konzentrationsabhängig die Freisetzung von PreS-haltigen Viruspartikeln in chronisch DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten - PreS dot-blot- Nachweis.**

Eine 7 Tage alte, chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozytenkultur wurde für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI (1 nanoM, 1 microM und 10 microM) behandelt bzw. nicht behandelt. 200 microl der jeweiligen Überstände wurden aufgedottet. Die Menge der freigesetzten viralen Partikeln wurde mittels eines PreS-Antigen spezifischen dot-blots bestimmt.

**Figur 7: Proteasom-Inhibitoren hemmen konzentrationsabhängig die Freisetzung von PreS-haltigen Viruspartikeln in chronisch DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten - PreS Western blot-Nachweis.**

Eine 7 Tage alte, chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozytenkultur wurde für 48h mit steigenden Konzentrationen von PI (1 nanoM, 10 nanoM, 1 microM, 3 microM und 10 microM) behandelt bzw. nicht behandelt. Die 5 microL der jeweiligen Überstände wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der PreS-Protein-Banden (p36 und p28) erfolgte durch Western blot.

**Figur 8: Proteasom-Inhibitoren hemmen konzentrationsabhängig die Freisetzung von DNA-haltigen Viruspartikeln in chronisch DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten (PEH) - DNA-dot-blot-Nachweis.**

Eine 7 Tage alte chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozytenkultur wurde für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI (10 nanoM, 1 microM, 3 microM und 10 microM) behandelt

bzw. nicht behandelt, der Überstand gesammelt und durch Zentrifugation geklärt. Danach wurde der Überstand auf Nitrozellulose aufgedotet und die Membran mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten DHBV-DNA-Sonde hybridisiert und autoradiographiert. Dots von nicht infizierten PEHs sind mit - gekennzeichnet, dots von infizierten Hepatozyten mit +. Die Standardisierung des DNA-dot-blots erfolgte durch Auftragung von bekannten Konzentrationen an klonierter DHBV-DNA (Standard DHBV-DNA).

**Figur 9: Proteasom-Inhibitoren haben keinen nennenswerten Einfluss auf die intrazelluläre PreS-Genexpression.**

7 Tage alte chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozytenkulturen (PEHs) wurden für 48 h mit steigenden Dosen PI behandelt. Zelllysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und zum Nachweis von PreS-Antigen geblottet. In Spuren 1 und 2 sind unbehandelte, nicht infizierte (-PEHs) bzw. chronisch DHBV-infizierte Hepatozyten (+PEHs) aufgetragen. Spuren 3 bis 7 entsprechen Aufträgen von mit unterschiedlichen Dosen an PI-behandelten Zellen. p36 und p28 entsprechen dem PreS-Protein voller Länge bzw. einem Degradationsprodukt desselben.

**Figur 10: Proteasom-Inhibitoren haben keinen nennenswerten Einfluss auf die Core-Expression.**

7 Tage alte chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozytenkulturen wurden für 48 h mit steigenden Dosen PI behandelt. Zelllysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und das Core-Protein (Pfeil) durch indirekte Chemolumineszenz dargestellt. In Spuren 1 und 2 sind nicht behandelte DHBV-negative (-PEHs) bzw. chronisch DHBV-infizierte Hepatozyten (+PEH) aufgetragen. Spuren 3 bis 7 entsprechen Aufträgen von mit unterschiedlichen Dosen an PI-behandelten Zellen.

**Figur 11: Akkumulation von poly-ubiquitinierten Proteinen in mit Proteasom-Inhibitoren behandelten primären Entenhepatozyten.**

Eine Woche alte, chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozyten wurden für 48 h mit steigenden Konzentrationen von PI (Spuren 2 bis 6) behandelt. Als Kontrolle wurden DHBV-infizierte (+PEHs, Spur 1) und Virus-freie Zellen ohne PI kultiviert (-PEHs, Spur 7). Anschließend wurden Zelllysate in 6% SDS-PAGE aufgetrennt und mono- sowie poly-ubiquitinierte Proteine mittels Kaninchen-anti-Ubiquitin nachgewiesen. Rechts ist die jeweilige Position der Proteinmarkerbanden in kDa angegeben. Polyubi. zeigt die hochmolekularen poly-ubiquitinierten Proteine an.

**Figur 12:** Überstände der mit Proteasom-Inhibitoren behandelten chronisch DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten-Kulturen (PEH) enthalten keine infektiösen Nachkommenviren.

- 5 7 Tage alte chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozyten wurden für 48 h mit 10 microM PI behandelt und anschließend der geerntete Zellkulturüberstand für die Neuinfektion von DHBV-negativen PEH-Kulturen benutzt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Abschließend erfolgte die Färbung der Zellen für PreS (grün). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechstfärbung (blau). Der obere bzw. untere Bereich  
10 der Figur ist eine niedrige bzw höhere Vergrößerung desselben Bildausschnittes.

**Figur 13:** Nachkommenviren aus chronisch DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten sind infektiös.

- Zellkulturüberstände einer 7 Tage alten chronisch infizierten primären Entenhepatozytenkultur  
15 wurden gesammelt und für die Neu-Infektion von DHBV-negativen primären Entenhepatozyten benutzt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert. Abschließend erfolgte die Färbung der Zellen für PreS (grün). Die Darstellung der Zellkerne erfolgte mittels Hoechstfärbung (blau). Der untere Bereich der Figur ist die höhere Vergrößerung desselben oben gezeigten Bildausschnittes.

20

**Figur 14:** Überstände der mit Proteasom-Inhibitoren behandelten DHBV-infizierten Hepatozyten enthalten keine infektiöse Nachkommenviren - Nachweis durch PreS-blot.

- 7 Tage alte chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozyten (PEH) wurden für 48 h mit 10 microM PI behandelt und anschließend der Überstand gesammelt, durch Zentrifugation geklärt  
25 und für de novo Infektion von PEHs benutzt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der PreS-Proteinbanden erfolgte durch Western blot. In Spuren 1 und 2 sind DHBV-negative bzw. chronisch DHBV-infizierte PEH aufgetragen. Spur 3 und 4 entsprechen PEHs, welche mit Überständen aus nicht behandelten bzw. PI-behandelten Kulturen infiziert wurden. Aufgetragen in Spur 5 sind PEHs, welche mit  
30 einer MOI von 20 infiziert wurden.

**Figur 15:** Überstände der mit Proteasom-Inhibitoren behandelten DHBV-infizierten Hepatozyten enthalten keine infektiösen Nachkommenviren  
- Nachweis durch Core blot.

7 Tage alte chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozyten (PEH) wurden für 48 h mit 10 microM PI behandelt und anschließend der Überstand gesammelt, durch Zentrifugation geklärt und für Neuinfektion von PEH-Kulturen benutzt. 60 h nach der Infektion wurden die Zellen lysiert und das Lysat durch 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung des Core-Proteins erfolgte durch Western blot. In Spuren 1 und 2 sind DHBV-negative bzw. chronisch DHBV-infizierte PEH aufgetragen. Spur 3 und 4 entsprechen PEH, welche mit Überständen aus nicht behandelten bzw. PI-behandelten Kulturen infiziert wurden. Aufgetragen in Spur 5 sind PEHs, welche mit einer MOI von 20 infiziert worden sind.

10 **Figur 16: Hemmung der Primär- und Sekundärinfektion durch Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren von primären Entenhepatozyten (PEH) infiziert mit DHBV.**

Vier Tage alte Kulturen von PEH wurden mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im neuen Medium für weitere drei Tage kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurden die Zellen entweder ohne Proteasom-Inhibitoren kultiviert  
15 (unbehandelt) oder mit jeweils 1 microM Eponemycin, Epoxomicin oder PI für weitere 3 Tage behandelt. Am 6. Tag der Infektion wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen für Core-Protein (grün). Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (blau). Die Phasenkontrastaufnahmen der jeweiligen Bildausschnitte sind ebenfalls zu sehen.

20

**Figur 17: Proteasom-Inhibitoren hemmen die Freisetzung des e-Antigens in DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten.**

Vier Tage alte primäre Entenhepatozyten (PEH) wurden mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im neuen Medium für weitere drei Tage  
25 kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurden die Zellen mit jeweils 1. microM PI (Spur 3) Epoxomicin (Spur 4), Eponemycin (Spur 5) für weitere drei Tage behandelt. Am 6. Tag nach der Infektion wurde der Überstand gesammelt, durch Zentrifugation geklärt. Ein Aliquot der Überstände wurde in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der e-Antigen-Protein-Banden (Pfeile) erfolgte durch indirekte Chemolumineszenz. In Spuren 1 und 2 sind nicht  
30 behandelte negative bzw. chronisch DHBV-infizierte PEH, in Spuren 3 PI, 4 Epoxomicin und 5 Eponemycin behandelte, DHBV infizierte PEH aufgetragen.

**Figur 18: Proteasom-Inhibitoren hemmen die Freisetzung des PreS-Antigens in DHBV-infizierten primären Entenhepatozyten.**

Vier Tage alte Hepatozyten-Kulturen wurden mit einer MOI von 20 für 16 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und im neuen Medium für weitere drei Tage kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurden die Zellen mit jeweils 1 microM PI (Spur 3), Epoxomicin (Spur 4) und Eponemycin (Spur 5) für weitere drei Tage behandelt. Am 6. Tag nach der Infektion wurde der Überstand gesammelt und in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Darstellung der PreS-Protein-Banden (p36 und p28) erfolgte im Western blot. In Spuren 1 und 2 sind nicht behandelte negative bzw. chronisch DHBV-infizierte PEH aufgetragen, DHBV infizierte PEH wurden aufgetragen in Spur 3 (PI), in Spur 4 (Epoxomicin), und in Spur 5 (Eponemycin).

**Figur 19: Suramin hemmt sowohl die primäre als auch die sekundäre DHBV-Infektion in primären Entenhepatozyten.**

Vier Tage alte PEH wurden 2 h vor der Infektion mit 100 microg/ml Suramin behandelt (Suramin Präinfektion) oder zunächst unbehandelt belassen (kein Suramin und Suramin 3d post Infektion). Anschließend wurden alle Zellen mit einer MOI von 20 infiziert. Nach 16 h Inkubation wurden die Kulturen gewaschen und mit neuem Medium weiter kultiviert. Am 3. Tag nach der Infektion wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen in "kein Suramin" und "Suramin prä Infektion" wurden für weitere drei Tage ohne und die Zellen in "Suramin 3d post Infektion" mit 100 microg/ml Suramin behandelt. Am 6. Tag der Infektion wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung der Zellen für Core-Protein (Core). Die Zellkerne wurden mit Hoechst gefärbt (Hoechst). Die Phasenkontrastaufnahmen der jeweiligen Bildausschnitte sind ebenfalls gezeigt (Phasenkontrast).

**Figur 20: Proteasom-Inhibitoren induzieren die Hypophosphorylierung des intrazellulären Core-Proteins in chronisch DHBV-infizierten primären Hepatozyten.**

7 Tage alte chronisch DHBV-infizierte primäre Entenhepatozytenkulturen wurden für 48 h mit steigenden Dosen PI behandelt und anschließend lysiert. Die Lysate wurden in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und das Core-Protein durch indirekte Chemolumineszenz dargestellt. In Spuren 1 und 2 sind nicht behandelte negative bzw. chronisch DHBV-infizierte PEH aufgetragen. Spuren 3 bis 6 entsprechen den mit PI behandelten Zellen. CorePP entspricht hyperphosphoryliertem und CoreP hypophosphoryliertem Core-Protein.

**Figur 21: Behandlung von primären Entenhepatozyten mit Proteasom-Inhibitoren schränkt nicht deren Vitalität und Funktionalität ein.**

7 Tage alte primäre Zellkulturen aus chronisch DHBV-infizierten Entenlebern wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration von PI (10 microM, 3 microM und 1 microM) behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen für 5 min mit FDA-haltigem Williams E Medium (5 microg/ml) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die erfolgreiche Konversion des FDA in Fluoreszein in Hepatozyten mittels eines Epifluoreszenzmikroskops beurteilt. Zellen mit grüner Färbung im Zytoplasma wurden als vital und funktionell angenommen. Die jeweiligen Fluoreszenz- (Fluoreszein) und die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen (Phasenkontrast) mit der Angabe der benutzten PI-Dosis werden gezeigt. Die weißen Pfeile mit Spitze zeigen beispielhaft auf Nester von nichtparenchymalen Zellen, welche im Vergleich zu Hepatozyten keine bzw. nur beschränkte FDA-Aufnahme und Konversion zeigen.

**Figur 22: Aufnahme und Konversion des Vitalmarkers Fluoreszeindiazetat in Fluoreszein erfolgt bevorzugt in Hepatozyten.**

Eine Woche alte primäre Zellkulturen aus chronisch DHBV-infizierten Entenlebern wurden für 5 min mit FDA-haltigem Williams E Medium (5 microg/ml) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die erfolgreiche Konversion des FDA in Fluoreszein in Hepatozyten mittels eines Epifluoreszenzmikroskops beurteilt. Zellen mit grüner Färbung im Zytoplasma wurden als vital und funktionell angenommen (Fluoreszein). Die zu dem selben Bildausschnitt korrespondierende Phasenkontrastaufnahme ist ebenfalls gezeigt (Phasenkontrast). Die weißen Pfeile mit Spitze zeigen beispielhaft auf Nester von nichtparenchymalen Zellen, welche im Vergleich zu den Hepatozyten keine bzw. nur beschränkte FDA-Aufnahme und Konversion zeigen.

**Figur 23: Behandlung von Hepatomazellen (HepG2) mit Proteasom-Inhibitoren schränkt deren Vitalität und Funktionalität ein.**

HepG2-Zellen wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration (10 microM, 3 microM und 1 microM, 100 nanoM, 10 nanoM und 1 nanoM) von PI (Abschnitt A), behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop begutachtet. Zellen mit dunkelblauer Färbung wurden als nicht-vital angenommen. Die jeweilige Konzentration des PI ist in den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen angegeben.



**Figur 24: Behandlung von Hepatomazellen (HepG2) mit Eponemycin schränkt deren Vitalität und Funktionalität ein.**

HepG2-Zellen wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration (10 microM, 3 microM und 1microM, 100 nanoM, 10 nanoM und 1 nanoM) von Eponemycin (Abschnitt A), behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop begutachtet. Zellen mit dunkelblauer Färbung wurden als nicht-vital angenommen. Die jeweilige Konzentration des Eponemycin ist in den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen angegeben.

**Figur 25: Behandlung von humanen Hepatomazellen, HepG2 mit Epoxomicin schränkt deren Vitalität und Funktionalität ein.**

HepG2-Zellen wurden 48 h lang mit steigenden Konzentration (10 microM, 3 microM und 1microM, 100 nanoM, 10 nanoM und 1 nanoM) von Epoxomicin (Abschnitt A), behandelt. Am Ende dieser Behandlungsperiode wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop begutachtet. Zellen mit dunkelblauer Färbung wurden als nicht-vital angenommen. Die jeweilige Konzentration von Epoxomicin ist in den entsprechenden Phasenkontrastaufnahmen angegeben.

**Tabelle 1: Proteasom-Inhibitoren verringern die Infektiosität von freigesetzten**

**Viruspartikeln.**

CD4+ T-Zellen (A3.01) wurden mit HIV-1NL4-3 infiziert und zum Zeitpunkt der maximalen Virusproduktion (ca. 7 Tage post Infektion) parallele Kulturen entweder ohne oder für 1 (+zLLL "-1hr") beziehungsweise 6 Stunden (+zLLL "-6hr") mit 40 microM zLLL behandelt. Danach wurden die Zellen gewaschen und für weitere 4.5 Stunden mit oder ohne 40 microM zLLL inkubiert. In einer parallelen Kultur wurden Zellen unmittelbar nach dem Waschen mit 40 microM zLLL behandelt (+zLLL "0hr"). Die Virus-haltigen Überstände wurden gesammelt, und die Menge an CA-Antigen wurde mittels ELISA quantifiziert. Die spezifische Infektiosität wurde als der infektiöse Virus-Titer per nanog CA ermittelt und im Verhältnis zu der nicht behandelten Kontroll-Kultur (100%) dargestellt.

## Literatur

- Adachi, A; Gentleman, HE; König, S; Folks, T; Willey, R; Rabson, A; Martin, MA (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**:284-291.
- Adams, J; Behnke, M; Chen, S; Cruickshank, AA; Dick, LR; Grenier, L; Klunder, JM; Ma, YT; Plamondon, L; Stein, RL (1998). Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**:333-338.
- Adams, J; Palombella, VJ; Sausville, EA; Johnson, J; Destree, A; Lazarus, DD; Maas, J.; Pien, CS; Prakash, S; Elliott, PJ (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res.* **59**:2615-2622.
- Adams, J; Palombella, VJ; Elliott, PJ (2000). Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. *Investigational New drugs* **18**:109-121.
- Adams, J; Stein, R (1996). Novel inhibitors of the proteasome and their therapeutic use in inflammation. *Annu. Rep. Med. Chem.* **31**:279-288.
- André, P; Grøttrup, M; Klenerman, P; de Giuli, R; Booth, BL Jr; Cerundolo, V; Bonneville, M; Jotereau, F; Zinkernagel, RM; Lotteau, V (1998). An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation, and T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13120-13124.
- Baumeister, W; Walz, J; Zuhl, F; Seemuller, E (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**:367-380.
- Bogyo, M; McMaster, JS; Gaczynska, M; Tortorella, D; Goldberg, AL; Ploegh, H (1997). Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the Escherichia coli homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:6629-6634.
- Bour, S; Schubert, U; Peden, K; Strebel, K (1996). The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances particle release: a Vpu-like factor? *J. Virol.* **70**:820-829.
- Breiner, KM; Urban, S; Glass, B; Schaller, H (2001). Envelope protein-mediated down-regulation of hepatitis B virus receptor in infected hepatocytes. *J. Virol.* **75**:143-50.
- Bruns, M; Miska, S; Chassot, S; Will, H (1998). Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J. Virol.* **72**:1462-1468.
- Bryant, JL; Gallo RC; Weichold FF (2000). Use of protease inhibitors to modulate cellular pathways, immunity and therapies associated therewith. Patent application WO 0033654.

Chen, HS; Kew, MC; Hornbuckle, WE; Tennant, BC; Cote, PJ; Gerin, JL; Purcell, RH; Miller, RL (1992). The precore gene of the woodchuck hepatitis virus genome is not essential for viral replication in the natural host. *J. Virol.* **66**:5682-5684.

Coux, O; Tanaka, K; Goldberg, AL (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:801-847.

Dandri, M; Burda, MR; Torok, E; Pollok, JM; Iwanska, A; Sommer, G; Rogiers, X; Rogler, CE; Gupta, S; Will, H; Greten, H; Petersen, J (2001). Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* **33**:981-988.

Doolittle, RF; Feng, DF; McClure, MA; Johnson, MS (1990). Retrovirus phylogeny and evolution. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **157**:1-18.

Elliott, PJ; Pien, CS; McCormack, TA; Capman, ID; Adams, J (1999). Proteasome inhibition: a novel mechanism to combat asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **104**:294-300.

Fenteany, G; Standaert, RF; Lane, WS; Choi, S; Corey, EJ; Schreiber, SL (1995). Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystein. *Science* **268**:726-731.

Fernholz, D; Wildner, G; Will, H (1993). Minor envelope proteins of duck hepatitis B virus are initiated at internal pre-S AUG codons but are not essential for infectivity. *Virology* **197**:64-73.

Frankel, A; Man, S; Elliott, P; Adams, J; Kerbel, RS (2000). Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin. Cancer Res.* **6**:3719-3728.

Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* **365**:264-267.

Gardner, RC; Assinder, SJ; Christie, G; Mason, GG; Markwell, R; Wadsworth, H; McLaughlin, M; King, R; Chabot-Fletcher, MC; Breton, JJ; Allsop, D; Rivett, AJ (2000). Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20 S and 26 S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells. *Biochem. J.* **346**:447-454.

Geier, E; Pfeifer, G; Wilm, M; Lucchiari-Hartz, M; Baumeister, W; Eichmann, K; Niedermann, G (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* **283**:978-981.

Glas, R; Bogyo, M; McMaster, JS; Gaczynska, M; Ploegh, HL (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature* **392**:618-622.

Hanada, M; Sugawara, K; Kaneta, K; Toda, S; Nishiyama, Y; Tomita, K; Yamamoto, H; Konishi, M; Oki, T (1992). Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J. Antibiot. (Tokyo)* **45**:1746-1752.

- Hershko, A; Ciechanover, A (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-479.
- Higashitsuji, H; Itoh, K; Nagao, T; Dawson, S; Nonoguchi, K; Kido, T; Mayer, RJ; Arai, S; Fujita, J (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat. Med.* 6:96-99.
- 5 Hu, Z; Zhang, Z; Doo, E; Coux, O; Goldberg, AL; Liang, TJ (1999). Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J. Virol.* 73:7231-40.
- Lightcap, ES; McCormack, TA; Pien, CS; Chau, V; Adams, J; Elliott, PJ (2000). Proteasome inhibition measurements: clinical application. *Clin. Chem.* 46:673-683.
- 10 Meng, L; Kwok, BH; Sin, N; Crews, CM (1999a). Eponemycin exerts its antitumor effect through the inhibition of proteasome function. *Cancer Res.* 59:2798-2801.
- Meng, L; Mohan, R; Kwok, BH; Eloffson, M; Sin, N; Crews, CM (1999b). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(18):10403-10408.
- 15 Moradpour, D; Grabscheid, B; Kammer, AR; Schmidtke, G; Gröttrup, M; Blum, HE; Cerny, A (2001). Expression of hepatitis C virus proteins does not interfere with major histocompatibility complex class I processing and presentation in vitro. *Hepatology* 33: 1282-1287.
- Murray, RZ; Norbury, C (2000). Proteasome Inhibitors as anti-cancer agents. *Anticancer Drugs* 11:407-417.
- 20 Ott, DE; Coren, LV; Copeland, TD; Kane, BP; Johnson, DG; Sowder, RC 2nd; Yoshinaka, Y; Oroszlan, S; Arthur, LO; Henderson, LE (1998). Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type-1 and simian immunodeficiency virus and the p12Gag protein of moloney murine leukemia virus. *J. Virol.* 72:2962-2968.
- Palombella, VJ; Conner, EM; Fuseler, JW; Destree, A; Davis, JM; Laroux, FS; Wolf, RE;
- 25 Huang, J; Brand, S; Elliott, PJ; Lazarus, D; McCormack, T; Parent, L; Stein, R; Adams, J; Grisham, MB (1998). Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15671-15676.
- Phillips, JB; Williams, AJ; Adams, J; Elliott, PJ; Tortella, FC (2000). Proteasome inhibitor PS-519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral
- 30 ischemia. *Stroke* 31:1686-1693.
- Pugh, JC; Simmons, H (1994). Duck hepatitis B virus infection of Muscovy duck hepatocytes and nature of virus resistance in vivo. *J. Virol.* 68:2487-94.

- Rehermann, B; Ferrari, C; Pasquinelli, C; Chisari, FV (1996). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat. Med.* 2:1104-1108.
- Rivett, AJ; Gardner, RC (2000). Proteasome inhibitors: from in vitro uses to clinical trials. *J. Pept. Sci.* 6:478-488.
- Rock, KL; Goldberg, AL (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17:739-779.
- Schäfer, S; Tolle, T; Lottmann, S; Gerlich, WH (1998). Animal models and experimental systems in hepatitis B virus research. In R. C. Koshy, W. H. (ed.), *Hepatitis B virus: Molecular mechanisms in disease and novel strategies for therapy*. Imperial College Press, London p. 51-74.
- Schmidtke, G; Holzhutter, HG; Bogyo, M; Kairies, N; Groll, M; de Giuli, R; Emch, S; Gröttrup, M (1999). How an inhibitor of the HIV-I protease modulates proteasome activity. *J. Biol. Chem.* 274:35734-35740.
- Schubert, U; Antón, LC; Bacik, I; Cox, JH; Bour, S; Bennink, JR; Orlowski, M; Strebel, K; Yewdell, JW (1998). CD4 glycoprotein degradation induced by Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin conjugating pathway. *J. Virol.* 72:2280-2288.
- Schubert, U; Clouse, KA; Strebel, K (1995). Augmentation of virus secretion by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is cell type independent and occurs in cultured human primary macrophages and lymphocytes. *J. Virol.* 69:7699-7711.
- Schubert, U; Antón, LC; Gibbs, J; Norbury, CC; Yewdell, JW; Bennink, JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-774.
- Schwartz, O; Marechal, V; Friguet, B; Arenzana-Seisdedos, F; Heard, J-M (1998). Antiviral activity of the proteasome on incoming human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:3845-3850.
- Schwartz, AL; Ciechanover, A (1999). The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50:57-74.
- Sells, MA; Chen, ML; Acs, G (1987). Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:1005-1009.
- Sirma, H; Weil, R; Rosmorduc, O; Urban, S; Israel, A; Kremsdorf, D; Brechot, C (1998). Cytosol is the prime compartment of hepatitis B virus X protein where it colocalizes with the proteasome. *Oncogene* 16: 2051-2063.

Suzuki, R; Tamura, K; Li, J; Ishii, K; Matsuura, Y; Miyamura, T; Suzuki, T (2001). Ubiquitin-mediated degradation of hepatitis C virus core protein is regulated by processing at its carboxyl terminus. *Virology* 280:301-309.

Swanstrom, R; Wills, J (1997). Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In  
5 Retroviruses, J. Coffin, S. Hughes and H. Varmus eds. (Plainview, NY: Cold Spring Harbor Press), pp. 263-334.

Teicher, BA; Ara, G; Herbst, R; Palombella, VJ; Adams, J (1999). The proteasome inhibitor PS-341 in cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 5:2638-2645.

Theodore, TS; Englund, G; Buckler-White, A; Buckler, CE; Martin, MA; Peden, KWC (1996).

10 Construction and characterization of a stable full-length macrophage-tropic HIV type 1 molecular clone that directs the production of high titers of progeny virions. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 12:191-194.

Trautwein, C; Manns, M (2001). Antivirale Therapie der chronischen Virushepatitis. *Internist* 42:913-923.

15 Voges, D; Zwickl, P; Baumeister, W (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:1015-1068.

Yagi, T; Hardin, JA; Valenzuela, YM; Miyoshi, H; Gores, GJ; Nyberg, SL (2001). Caspase inhibition reduces apoptotic death of cryopreserved porcine hepatocytes. *Hepatology* 33:1432-40.

**Abkürzungsverzeichnis**

|    |           |  |
|----|-----------|--|
|    | A3.01     | humane CD4 <sup>+</sup> T-Zelllinie                      |
| 5  | AIDS      | Aquired Immunodeficiency Syndrome                        |
|    | Annexin-V | Zellrezeptor Annexin-Fünf                                |
|    | ATP       | Adenosin-5'-triphosphat                                  |
|    | BIV       | Bovines Immundefizienzvirus                              |
|    | BLV       | Bovines Leukämievirus                                    |
| 10 | CA        | capsid (HIV-1 p24 <sup>CA</sup> Antigen)                 |
|    | cccDNA    | komplett doppelsträngig supergecoiltes DNA-Genom         |
|    | CFTR      | Cystis Fibrosis Transmembran Regulator                   |
|    | d         | Tag  |
|    | DHB(V)    | Enten-Hepatitis-B(-Virus)                                |
| 15 | DHBV      | Enten-Hepatitis-B-Virus                                  |
|    | DMEM      | Dulbeccos' modifizierten Eagle's Medium                  |
|    | DMSO      | Dimethylsulfoxid   |
|    | DNA       | desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)          |
|    | ECL       | enhanced chemiluminescence                               |
| 20 | EDTA      | Ethylendiamintetraessigsäure                             |
|    | EIAV      | Equine Infectious Anemia Virus                           |
|    | ELISA     | Enzyme Linked Immunosorbent Assay                        |
|    | Env       | Envelope   |
|    | ER        | Endoplasmatisches Retikulum                              |
| 25 | FDA       | Fluoreszeindiazetat                                      |
|    | FIV       | Feline Leukemia Virus                                    |
|    | Gag       | Gruppenspezifisches Antigen, Core Protein von Retroviren |
|    | h         | Stunde(n)  |
|    | hr        | Stunde(n)  |
| 30 | HAART     | HAART-Therapie (highly active antiretroviral therapy)    |
|    | HAV       | Hepatitis-A-Virus  |
|    | HBe       | Hepatitis-B-Virus E-Antigen                              |
|    | HBs       | HBV-Oberflächenprotein                                   |
|    | HBV       | Hepatitis-B-Virus  |

|    |                        |  |
|----|------------------------|--|
|    | HCC                    | Hepatozelluläres Karzinom  |
|    | HCV                    | Hepatitis-C-Virus  |
|    | HDV                    | Hepatitis-Delta-Virus  |
|    | HEPES                  | (N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])                      |
| 5  | HEV                    | Hepatitis-E-Virus  |
|    | HFV                    | Hepatitis-F-Virus  |
|    | HGV                    | Hepatitis-G-Virus  |
|    | HIV                    | Humanes Immundefizienzvirus  |
|    | HIVAN                  | HIV associated nephropathy Syndrom   |
| 10 | HIV-1 <sub>NL4-3</sub> | Humanes Immundefizienzvirus, infektiöser Klon NL4-3                            |
|    | HLS                    | HIV-associated lipodystrophy syndrome  |
|    | HPV                    | Humanes Papilloma-Virus  |
|    | HTLV                   | Humanes T-Zell Leukämie Virus  |
|    | i.d.R.                 | in der Regel   |
| 15 | IFN                    | Interferon   |
|    | IL                     | Interleukin  |
|    | kb                     | Kilobasen  |
|    | IκB                    | inhibitorischen Faktor IκB   |
|    | kDa                    | Kilodalton (Maß für Molekulargewicht)  |
| 20 | Ki                     | inhibitorische Konstante   |
|    | LC                     | Lactacystin  |
|    | L-Domäne               | late assembly domain, späte Assemblierungsdomäne in retroviralen Gag-Proteinen |
|    | LLnL                   | Leuzinyl- Leuzinyl-nor-Leuzinal  |
| 25 | MA                     | Matrix, (p17 <sup>MA</sup> Protein von HIV-1)                                  |
|    | MDa                    | Megadalton   |
|    | MG132                  | N-carbobenzoxyl-L-leuciny-L-leuciny-L-leucinal                                 |
|    | MG232                  | Borsäure-Derivat von MG132   |
|    | MHC                    | Major Histocompatibilitäts Komplex   |
| 30 | Mo-MuLV                | Murines Leukämie-Virus   |
|    | MOI                    | multiplicity of infection  |



|                   |   |
|-------------------|---|
| MT-4-Zellen       | humane CD4 <sup>+</sup> T-Zelllinie, HTLVI transformiert  |
| nanoM             | nano Molar (nM)   |
| NC                | Nukleokapsid,   |
| NF-κB             | Transkriptionsfaktor  |
| 5 NLVS            | 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leuciny-L-Leuciny-L-Leucin-vinyl-sulfon, auch bezeichnet als NLVS |
| nM                | nano Mol  |
| ocDNA             | offen zirkuläre Form der DANN   |
| p27 <sup>CA</sup> | capsid (HIV-2 p27 <sup>CA</sup> Antigen)  |
| 10 PBS            | Phosphatpuffer, phosphate buffered saline   |
| PCR               | polymerase chain reaction - Polymerase-Kettenreaktion   |
| PEH               | Entenhepatozyten / Pekingentenhepatozyten   |
| PGPH              | Postglutamyl-Peptid hydrolysierende   |
| PI                | Proteasom-Inhibitor   |
| 15 Pol            | Polymerase (Retroviren)   |
| P-Protein         | Hepatitis-B-Virus Polymerase Protein  |
| PR                | Protease  |
| Pr55              | Prekursor Gag Protein von HIV-1   |
| Pr58              | Prekursor Gag Protein von HIV-2   |
| 20 PreS           | großes Hepatitis-B-Virus Hüllprotein, PräS  |
| PS                | ProScript   |
| PS-273            | Morpholin-CONH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH) <sub>2</sub>   |
| PS-293            | Enantiomer von PS-273   |
| PS-296            | 8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH(-CH-isobutyl)-  |
| 25                | B(OH) <sub>2</sub>  |
| PS-303            | NH <sub>2</sub> (CH-Naphtyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH) <sub>2</sub>  |
| PS-325            | 2-Quinol-CONH-(CH- <i>homo</i> -Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-   |
|                   | B(OH) <sub>2</sub> ;  |
| PS-334            | CH <sub>3</sub> -NH-(CH-Naphtyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH) <sub>2</sub> ;                                  |
| 30 PS-341         | N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-leuzin-Borsäure,  |
|                   | Molekülformel: C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> BN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>                             |
| PS-383            | Pyridyl-CONH-(CH- <i>p</i> F-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-  |
|                   | B(OH) <sub>2</sub>  |
| PS-519            | 1R-[1S, 4R, 5S]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-  |

oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dion, Molekülformel:  $C_{12}H_{19}NO_4$

PSI N-Carbobenzoxyl-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H

RNA Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)

RSV Rouse Sarcoma Virus

5 RT Reverse Transkriptase

SDS Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfate)

SDS-PAGE SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

SIV Simian immunodeficiency virus

TBS tris buffered saline

10 TNF Tumornekrosefaktor

Thr Threonin

Tris Tris-Puffer - Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Ub Ubiquitin

UPS Ub-Proteasom-System

15 Vpu Virus Protein U

WB Western blot

XXX Kategorie XXX = Literatur-Stellen nach dem Prioritätsdatum

zLLL N-carbobenzoxyl-L-leuciny-L-leuciny-L-leucinal

**Patentansprüche**

1. Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass sie als wirksame  
5 Komponente mindestens einen Proteasom-Inhibitor enthalten.
2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie gegen Viren eingesetzt werden, die  
im Rahmen des Replikationszyklus von der Zelloberfläche freigesetzt werden und dass die  
wirksamen Komponenten als Proteasom-Inhibitoren in einer pharmazeutischen Zubereitung  
10 Substanzen enthalten, welche die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pathway hemmen,  
regulieren oder anderweitig beeinflussen.
3. Mittel nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass zur Hemmung der Freisetzung,  
Reifung und Replikation von Retroviren sowie von Hepatitisviren als Proteasom-Inhibitoren  
15 Substanzen eingesetzt werden, die speziell die enzymatischen Aktivitäten des kompletten 26S  
Proteasom-Komplexes und der freien, nicht mit regulatorischen Untereinheiten assemblierten  
20S katalytisch aktiven Proteasom-Struktur beeinflussen.
4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass Substanzen eingesetzt werden, die als  
20 Proteasom-Inhibitoren von Zellen höherer Eukaryoten aufgenommen werden und nach  
Zellaufnahme mit den katalytischen Untereinheiten des Proteasoms in Wechselwirkung treten  
und dabei alle oder einzelne der proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms - die Trypsin-, die  
Chymotrypsin- und die Postglutamyl-Peptid hydrolysierenden Aktivitäten - innerhalb des 26S  
oder auch des 20S Proteasom-Komplexes irreversibel oder reversibel blockieren.
- 25 5. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutischen  
Zubereitungen neben Proteasom-Inhibitoren auch andere Mittel enthalten, welche das zelluläre  
Ubiquitin-System beeinflussen, regulieren oder hemmen, wie die Aktivitäten
- 5.1. der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme und/oder  
30 5.2. der Ubiquitin-hydrolysierenden Enzyme  
5.3. von zellulären Faktoren, die mit Ubiquitin in Wechselwirkung treten  
5.4. von zellulären Faktoren, die mit Ubiquitin als  
5.4.1. Mono-Ubiquitin oder als  
5.4.2. Poly-Ubiquitin

in Wechselwirkung treten.

6. Mittel nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die in verschiedenen Formen *in vivo* oral, intravenös, intramuskulär, subkutan oder in verkapselter Form mit oder ohne Zellspezifität-tragende Veränderungen verabreicht werden, aufgrund der Anwendung eines bestimmten Applikations- und/oder Dosis-Regimes eine geringe Zytotoxizität aufweisen, keine oder unbedeutende Nebenwirkungen auslösen, eine relative hohe metabolische Halbwertszeit und eine relative geringe Clearance-Rate im Organismus aufweisen.

7. Mittel nach Anspruch 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die

a) in natürlicher Form aus Mikroorganismen oder anderen natürlichen Quellen isoliert werden oder

b) durch chemische Modifikationen aus natürlichen Substanzen hervorgehen

c) total-synthetisch hergestellt werden

d) durch gentherapeutische Verfahren *in vivo* synthetisiert werden

e) durch gentechnische Verfahren *in vitro* oder

f) in Mikroorganismen hergestellt werden.

8. Mittel nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Proteasom-Inhibitoren Substanzen eingesetzt werden, die folgenden Substanzklassen angehören:

a) natürlich vorkommende Proteasom-Inhibitoren:

- Peptid-Derivate, welche C-terminal Epoxyketon-Strukturen enthalten

-  $\beta$ -Lacton-Derivate

- Aclacinomycin A (auch bezeichnet als Aclarubicin),

- Lactacystin und dessen chemische modifizierte Varianten, wie der Zellmembranpenetrierenden Variante "Clastolactacystein  $\square$ -Lacton"

b) synthetisch hergestellte Proteasom-Inhibitoren:

- modifizierte Peptidaldehyde wie N-carbobenzoxyl-L-leucinyll-L-leucinyll-L-leucinal (auch bezeichnet als MG132 oder zLLL), dessen Borsäure-Derivat MG232; N-Carbobenzoxyl-Leu-Leu-Nva-H (bezeichnet als MG115; N-Acetyl-L-Leuzinyll-L-Leuzinyll-L-Norleuzinal (bezeichnet als LLnL), N-Carbobenzoxyl-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (auch bezeichnet als PSI);

c) Peptide, welche C-terminal eine  $\alpha,\beta$ -Epoxyketon-Struktur tragen, ferner Vinyl-sulfone wie

ERSATZBLATT (REGEL 26)

- 8.c)1. Carbobenzoxy-L-Leuciny-L-Leuciny-L-Leucin-vinyl-sulfon oder  
8.c)2. 4-Hydroxy-5-iodo-3-nitrophenylactetyl-L-Leuciny-L-Leuciny-L-Leucin-vinyl-sulfon (NLVS)  
d) Glyoxal- oder Borsäure-Reste wie  
5 8.d)1. Pyrazyl-CONH(CHPhe)CONH(CHisobutyl)B(OH)<sub>2</sub>) sowie  
8.d)2. Dipeptidyl-Borsäure-Derivate  
oder  
e) Pinacol-Ester - wie Benzyloxycarbonyl(Cbz)-Leu-Leu-boroLeu-Pinacol-Ester.
- 10 9. Mittel nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren die Epoxyketone  
9.1. Epoxomicin (Epoxomycin, Molekülformel: C<sub>28</sub>H<sub>86</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) und/oder  
9.2. Eponemycin (Eponemicin, Molekülformel: C<sub>20</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)  
eingesetzt werden.
- 15 10. Mittel nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass als besonders geeignete Proteasom-Inhibitoren aus der PS-Serie die Verbindungen  
10.1. PS-519 als β-Lacton- sowie als Lactacystin-Derivat die Verbindung 1R-[1S, 4R, 5S]]-1-(1-Hydroxy-2-methylpropyl)-4-propyl-6-oxa-2-azabicyclo[3.2.0]heptane-3,7-dione  
20 Molekülformel C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub> - und/oder  
10.2. PS-314 als Peptidyl-Borsäure-Derivat die Verbindung N-Pyrazinecarbonyl-L-Phenylalanin-L-Leuzin-Borsäure - Molekülformel C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>BN<sub>4</sub>O<sub>4</sub> - und/oder  
10.3. PS-273 (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) und dessen Enantiomer PS-293 und/oder  
25 10.4 die Verbindung PS-296 (8-Quinolyl-sulfonyl-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) und/oder  
10.5. PS-303 (NH<sub>2</sub>(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) und/oder  
10.6. PS-321 als (Morpholin-CONH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Phenylalanin)-B(OH)<sub>2</sub>); - und/oder  
30 10.7. PS-334 (CH<sub>3</sub>-NH-(CH-Naphthyl)-CONH-(CH-Isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) und/oder  
10.8 die Verbindung PS-325 (2-Quinol-CONH-(CH-homo-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) und/oder

10.9. PS-352 (Phenylalanin-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH-(CH-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) und/oder

10.10. PS-383 (Pyridyl-CONH-(CH<sub>2</sub>F-Phenylalanin)-CONH-(CH-isobutyl)-B(OH)<sub>2</sub>) eingesetzt werden.

5

11. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren der Ansprüche 1 bis 10 zur Behandlung von Virus-Infektionen.

12. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 in pharmazeutischen  
10 Zubereitungen zur Behandlung von Infektionen mit Hepatitis- und Retroviren.

13. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Retroviren sowie von Hepatitisviren.

15 14. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 13 zur Hemmung von späten Prozessen im Replikationszyklus von Retroviren sowie von Hepatitisviren.

15. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Assemblierung und Freisetzung von Virionen von der Zelloberfläche gehemmt werden.

20

16. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass im Falle von Retroviren die proteolytische Prozessierung der Gag-Strukturproteine durch die virale Protease gehemmt wird.

25 17. Verwendung nach Anspruch 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) Spumaviren oder
  - b) Mammalian C-Typ Oncoviren oder
  - c) BLV (Bovine Leukemia Virus) oder
  - 30 d) HTLV (Human T-Cell Leukemia Virus) oder
  - e) Leukämieviren oder
  - f) RSV (Rous Sarcoma Virus) Viren oder
  - g) Lentiviren
- gehemmt werden.

18. Verwendung nach Anspruch 17e, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung und Replikation von

- a) BLV oder
  - 5 b) HTLV-I oder
  - c) HTLV-II
- gehemmt werden.

19. Verwendung nach Anspruch 17g, dadurch gekennzeichnet, dass die Freisetzung, Reifung  
10 und Replikation von

- a) Humanes Immundefizienzvirus Type 1 (HIV-1) oder
  - b) Humanes Immundefizienzvirus Type 2 (HIV-2) oder
  - c) Affenimmundefizienzvirus (SIV) oder
  - d) Katzen-Immundefizienzvirus (FIV)
  - 15 e) Rinder-Immundefizienzvirus (BIV)
- gehemmt werden.

20. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 14 zur Bekämpfung /  
Behandlung von Erkrankungen / pathologischen Erscheinungen, die durch Infektionen mit  
20 Retroviren verursacht wurden.

21. Verwendung nach Anspruch 20 zur Bekämpfung / Behandlung von Erkrankungen /  
pathologischen Erscheinungen, die durch

21.1. Infektionen mit Leukämieviren

25 21.2. humane T-Zell Leukämieviren HTLV-I und HTLV-II

21.3. Infektionen mit Lentiviren  
verursacht wurden.

22. Verwendung nach Anspruch 21.3 zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS.

30

23. Verwendung nach Anspruch 22 in Kombination mit

23.1. anderen anti-retroviralen Medikamenten

23.2. Blockern der Reversen Transkriptase und/oder der viralen Protease

23.3. anti-retroviralen Therapien basierend auf gentherapeutischen Interventionen

ERSATZBLATT (REGEL 26).

23.4. intrazellulärer Immunisierung

23.5. dem Einbringen von anti-HIV-1/HIV-2 wirksamen Genen in Stammzellen und/oder peripheren CD4<sup>+</sup> Lymphozyten

5 24. Verwendung nach Anspruch 22 zur Bekämpfung / Behandlung von AIDS in fortgeschrittener Krankheitsphase.

25. Verwendung nach Anspruch 22 zur Verhinderung des Krankheitsausbruches und zur Reduzierung der Infektionsausbreitung im Organismus (Reduzierung von "viral load") von  
10 symptomlosen HIV-1/HIV-2 seropositiven und HIV-1/HIV-2 infizierten Personen.

26. Verwendung nach Anspruch 22 zur Behandlung / Bekämpfung / Verhinderung von HIV-induzierter Demenz, insbesondere zur Verhinderung der HIV-Infektion von Neuronen, Glia, und Endothelzellen in Kapillaren des Gehirns.

15 27. Verwendung nach Anspruch 22 zur Verhinderung der Etablierung einer systemischen HIV-1/HIV-2 Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösen Viren, etwa bei Nadel-Stich-Verletzungen mit HIV-kontaminiertem Blut oder Blutprodukten.

20 28. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 5 und 11 bis 14

28.1. in der Grundlagenforschung und angewandten Forschung,

28.2. zum Verständnis der Retrovirusassemblierung,

28.3. zum Verständnis der Wirkungsweise der viralen Proteasen,

28.4. zum Verständnis der Gag-Prozessierung von Retroviren,

25 28.5. zum Verständnis zellulärer Mechanismen, involviert in den späten Prozess der Retrovirus-Assemblierung, wie

28.5.1. von Faktoren des Ubiquitin-Proteasom-Systems,

28.5.2. von Ubiquitin-bindenden Faktoren,

28.5.3. von Faktoren, welche an ubiquitinierte Gag-Proteine von Retroviren binden,

30 28.5.4. von Faktoren, welche an mono-ubiquitinierte L (late assembly)-Domänen von retroviralen Gag-Proteinen binden,

28.5.5. von zellulären Faktoren, welche die mono-Ubiquitinierung von L-Domänen von Retroviren steuern, regulieren, beeinflussen und / oder hemmen,



28.5.6. von zellulären Faktoren, welche die mono-Ubiquitinierung von L-Domänen in Gag-Proteinen von Retroviren durch De-Ubiquitinierung rückgängig machen,

28.5.7. von zellulären Faktoren, welche späte Prozesse der Virusassemblierung, speziell der Ablösung von Viruspartikeln von der Zellmembran in Abhängigkeit der mono-Ubiquitinierung  
5 von L-Domänen in retroviralen Gag-Proteinen steuern, regulieren, beeinflussen und / oder hemmen,

28.6. zum Verständnis bei der Entwicklung von weiteren Substanzen, welche die retrovirale Gag-Prozessierung sowie die Assemblierung und die Freisetzung von Retroviren durch Beeinflussung der Wechselwirkung von retroviralen Gag-Proteinen mit dem Ubiquitin-  
10 Proteasom-System steuern, regulieren, beeinflussen und / oder hemmen können.

29. Verwendung nach Anspruch 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren

29.1. die Produktion von infektiösen Virionen von Hepatitisvirus-infizierten Zellen weitgehend oder vollkommen unterbinden

15 29.2. die Hemmung der Freisetzung von Virionen wie auch eine nahezu vollständige Reduktion der Infektiosität der freigesetzten Virionen bewirken

29.3. die Virusvermehrung und somit die Neuinfektion von Hepatozyten und damit die Ausbreitung einer Hepatitis-Infektion *in vivo* in dem Lebergewebe eines Infizierten unterdrücken.

20

30. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 14 zur Hemmung der Vermehrung von Hepadnaviren nach den Mechanismen

a) Blockierung/Reduktion der Freisetzung von neuen Virionen

b) Blockierung/Reduktion der Infektiosität von freigesetzten Virionen

25 c) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung in Kulturen von primären Hepatozyten

d) Blockierung/Reduktion der Infektionsausbreitung *in vivo* in dem Lebergewebe eines Infizierten.

31. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 14 zur

30 31.1. Induktion des Absterbens von Hepato-Karzinomzellen

31.2. Unterdrückung und/oder Verhinderung des Entstehens von Leberzellkarzinomen

31.3. Therapie von Patienten mit etablierten Leberzellkarzinomen.

32. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 31 zur Behandlung/ Bekämpfung /Verhinderung von

32.1. HBV-induzierter Leberzirrhose und/oder

32.2. HBV-induzierten Leberzellkarzinomen

5 32.3. HCV-induzierten Leberkarzinomen

32.4. Medikamenten-induzierten Leberkarzinomen

32.5. genetisch bedingten Leberkarzinomen

32.6. durch Umwelt-bedingte Leberkarzinome.

10 33. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 31 und 32 zur gezielten Eliminierung von Leberkarzinomzellen, welche infolge einer

33.1. HBV-Infektion und/oder

33.2. HCV-Infektion oder

33.3. entsprechenden Koinfektion mit beiden Viren oder

15 33.4. HDV/HBV-Koinfektion

entstehen.

34. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 31 bis 33 zur Verhinderung der Entstehung, des Wachstums und der Metastasierung von Leberzelltumoren sowie zur

20 bevorzugten Zerstörung von Leberkarzinomzellen in HBV- und HCV-infizierten Patienten und Tieren.

35. Verwendung nach Anspruch 11 bis 14 zur

35.1. Modulation der Expression, Modifizierung und Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins

25 p53

35.2. Reduktion der Anzahl infizierter und Hepatitisviren produzierender Zellen im Leberzellgewebe

35.3. Hemmung sowohl der Erhaltung und Persistenz einer bereits etablierten Infektion mit Hepatitisviren wie auch einer Sekundärinfektion und somit der Ausbreitung einer Infektion,

30 einschließlich der Blockierung der Ausbreitung einer Infektion mit Hepatitisviren *in vivo*.

36. Verwendung nach Anspruch 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass Proteasom-Inhibitoren die Phosphorylierung von Hepatitisvirus spezifischen Nukleokapsid-Proteinen verändern und

dadurch die Freisetzung und Infektiosität von Hepatitis-B- und C-Viren herabsetzen oder blockieren.

37. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 1 bis 10 in Kombination

5 untereinander

37.1. zur Behandlung und Bekämpfung von Hepatitiden

37.2. mit bereits in der anti-viralen Therapie von Hepadnaviren verwendeten Therapeutika.

38. Verwendung nach Anspruch 11 bis 14 und 37 zur Behandlung von Koinfektionen mit HBV

10 und Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2.

39. Verwendung nach Anspruch 38 zur Behandlung von HBV/HIV-Koinfektionen in Kombination mit der HAART-Therapie.

40. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 14 zur Behandlung von Infektionen mit Hepatitisviren zur Verhinderung

40.1. einer Re-Infektion mit HBV bei Leber- und anderen Organtransplantationen

40.2. einer Re-Infektion mit HBV bei Zelltherapien durch Gabe der Mittel vor, während und nach der Transplantation

20 40.3. einer Re-Infektion mit HBV bei der Transplantation von virusfreien Organen auf chronische Virusträger, die immer Restvirus haben und sich neue Organe infizieren können wie auch bei der Übertragung von Virus-haltigen Organen von Spendern auf virusfreie Patienten  
40.4. der Etablierung einer systemischen Hepatitisvirus-Infektion unmittelbar nach Kontakt mit infektiösem Virus.

25

41. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 11 bis 14 zur Behandlung von Infektionen mit Hepatitisviren

41.1. zur Vorbeugung einer Hepatitisvirus-Infektion bei Personen mit hohem Risiko einer Neuinfektion, wie bei Ärzten, Risiko-Personal in Häusern mit hohem Besucherverkehr,

30 Drogenabhängigen, Reisenden in hochendemische Gebiete für Hepatitisviren, in der Krankenbehandlung oder für Familienangehörige von chronischen Virusträgern

41.2. zur Minderung oder Eliminierung einer Leberentzündung durch Immunsystem-vermittelte Mechanismen.

42. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 1 bis 10 zur Herstellung von Mitteln und/oder pharmazeutischen Zubereitungen zur Hemmung der Freisetzung, Reifung und Replikation von Hepatitisviren und von Retroviren.

5 43. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 42 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von Hepatitiden und von durch Retroviren verursachten Erkrankungen.

44. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 42 und 43 bei retroviralen  
10 Erkrankungen sowie zur Herstellung von Arzneimitteln für die Behandlung von HIV-induzierten pathologischen Erscheinungen wie AIDS und AIDS-assoziierte Erkrankungen.

45. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 44 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von HIV-induzierter Demenz.

15

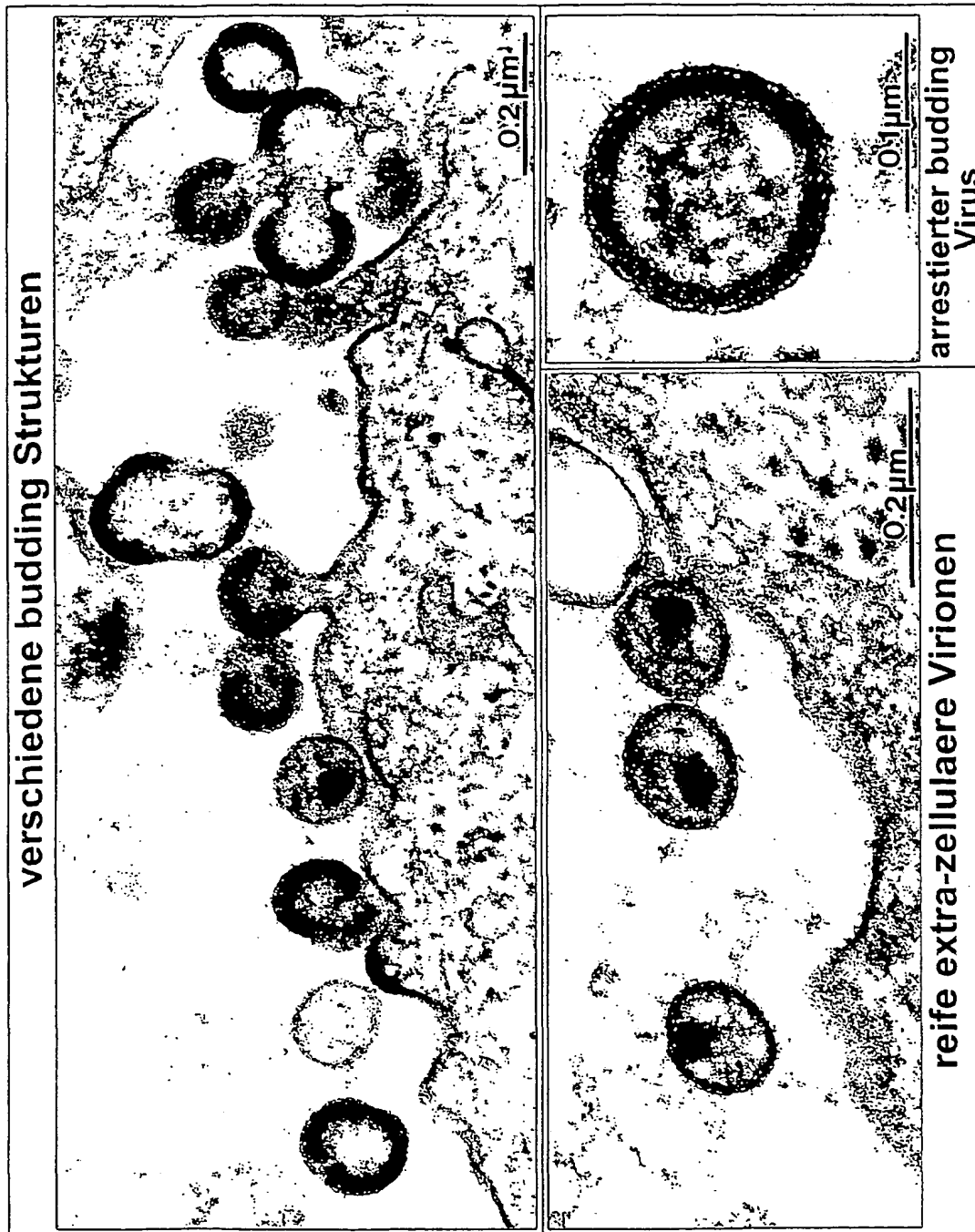
46. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 44 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von HIV-induzierten Störungen im Lipidstoffwechsel, speziell dem HLS Syndrom (HIV-associated lipodystrophy syndrome).

20 47. Verwendung von Proteasom-Inhibitoren nach Anspruch 44 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung und Prophylaxe von HIV-induzierten Störungen in der Nierenfunktion, speziell dem HIVAN Syndrom (HIV associated nephropathy).

25

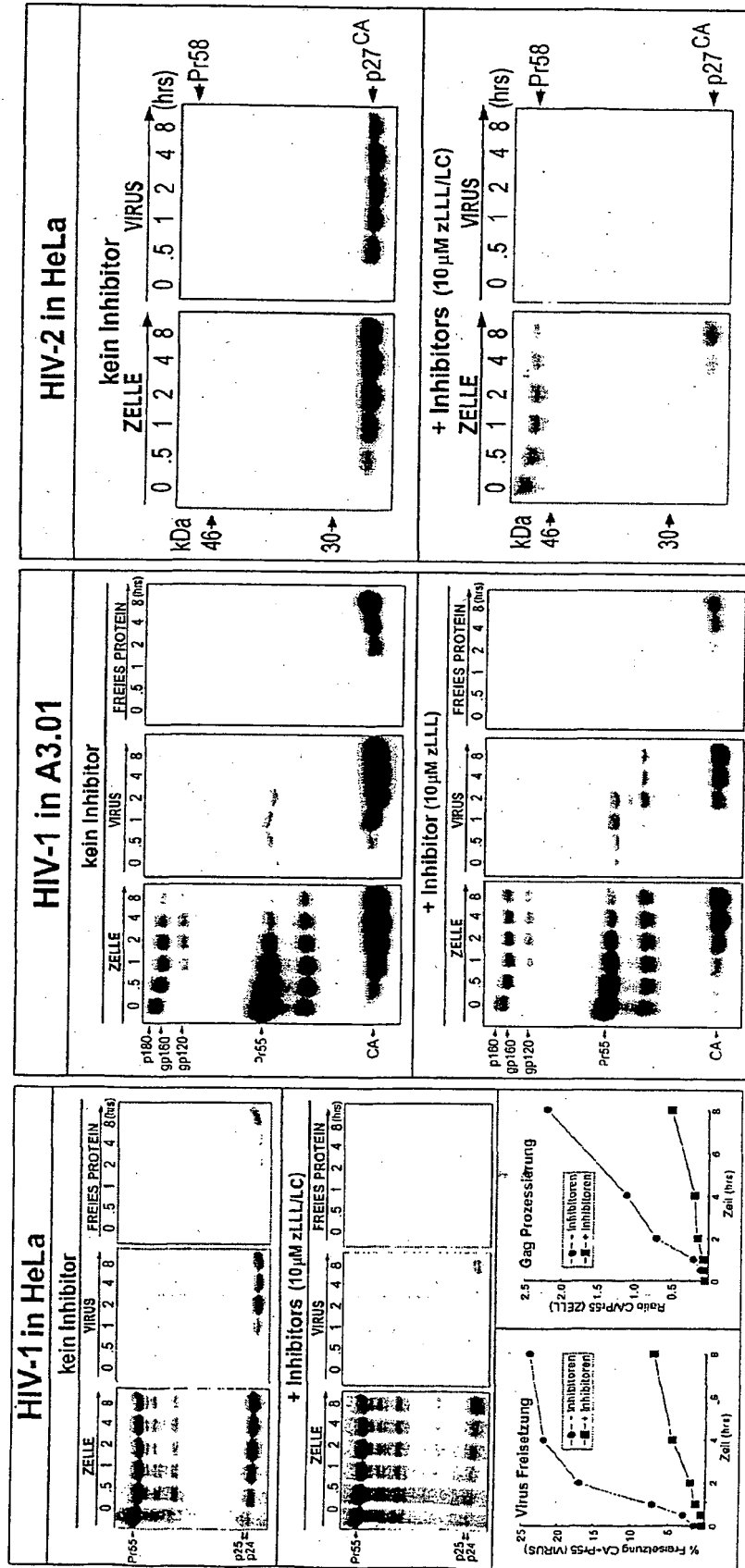
1/25

Figur 1



2/25

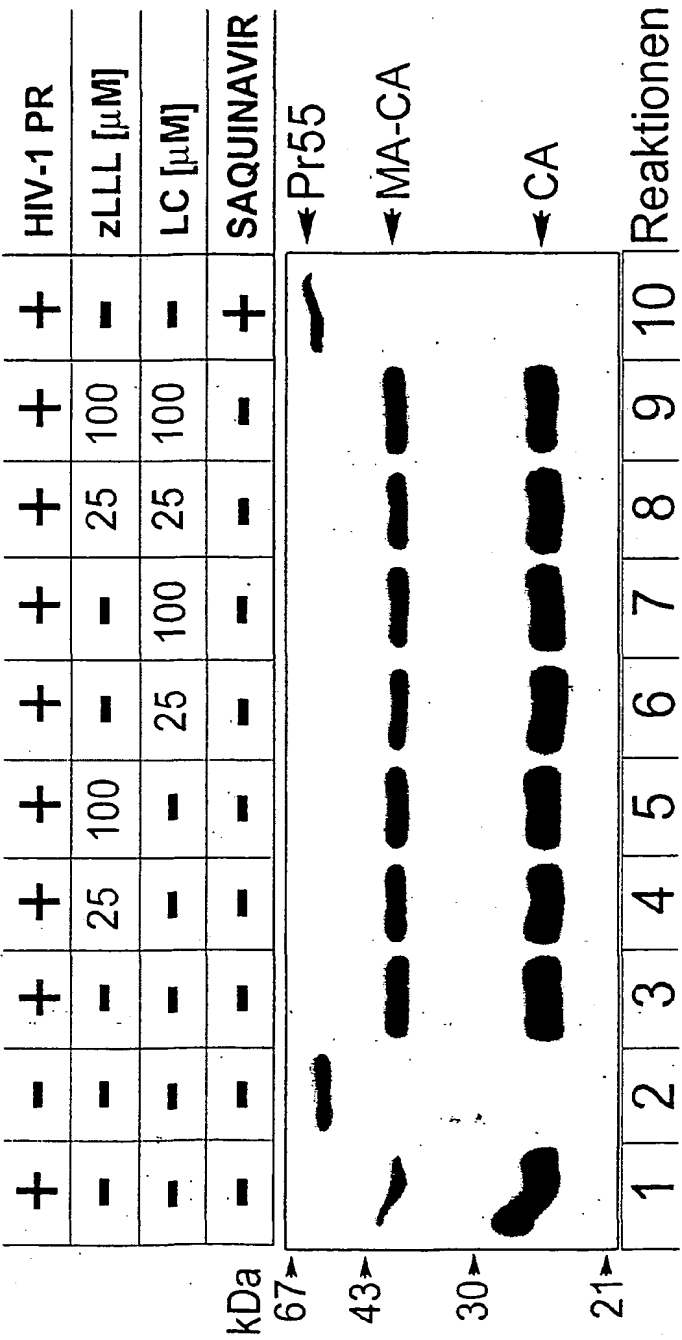
Figur 2



ERSATZBLATT (REGEL 26)

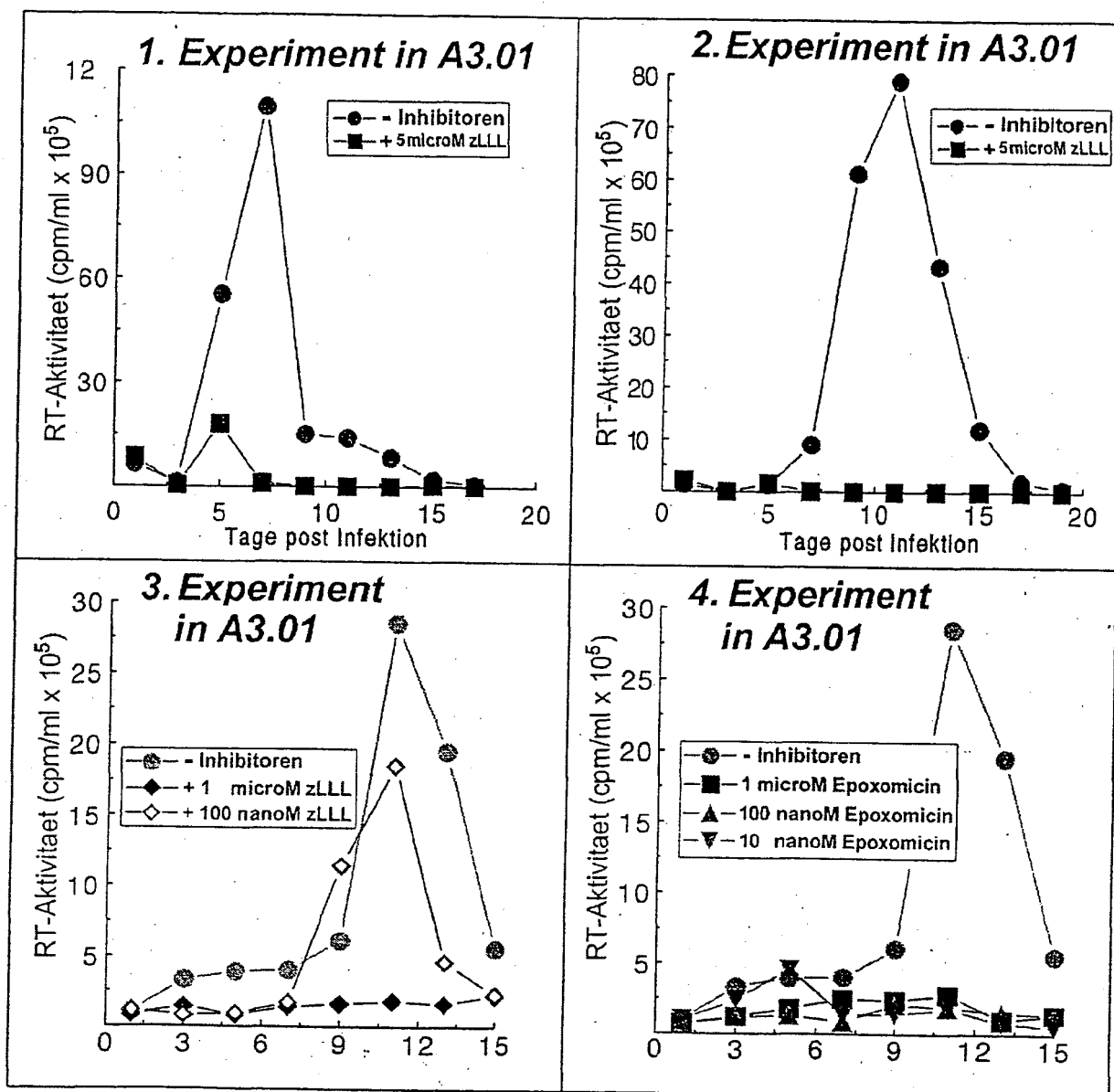
3/25

Figur 3



4/25

Figur 4

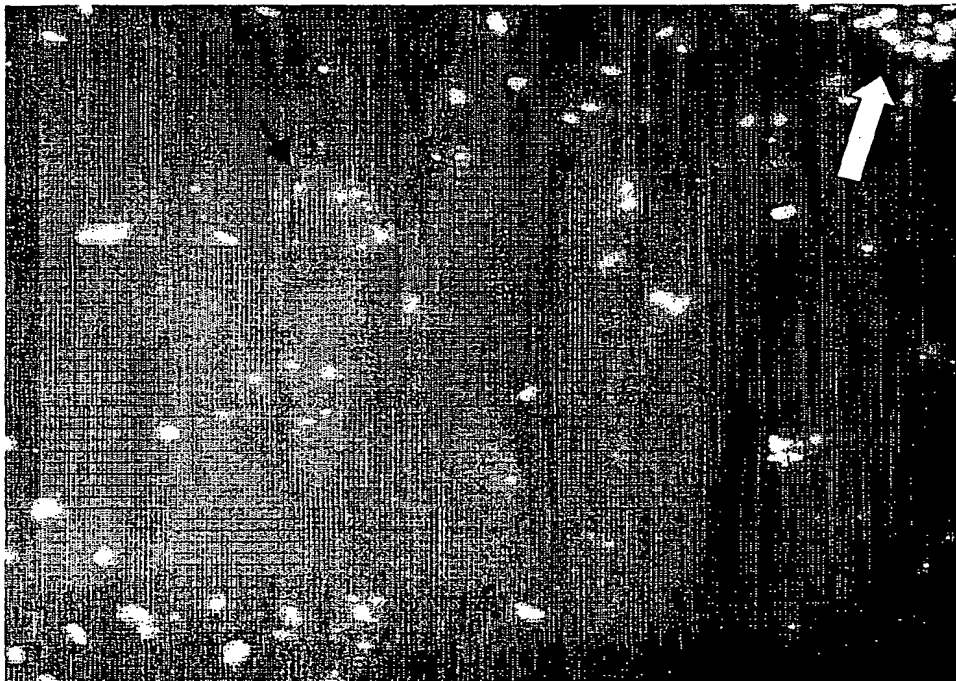




5/25

Figur 5

Phasenkontrast

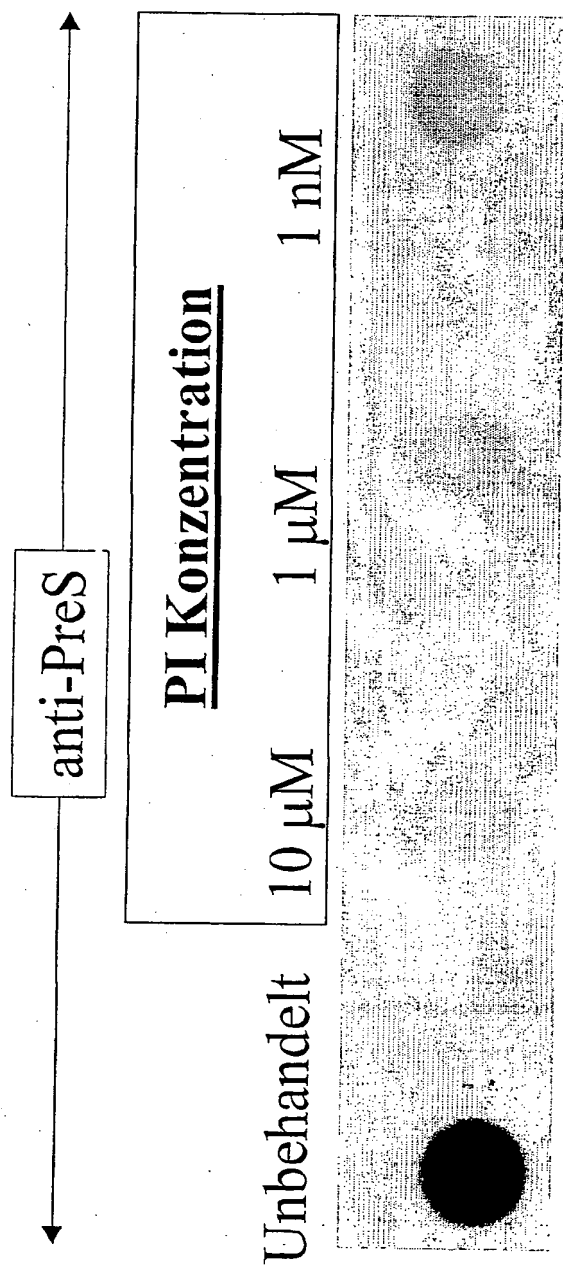


Hoechst

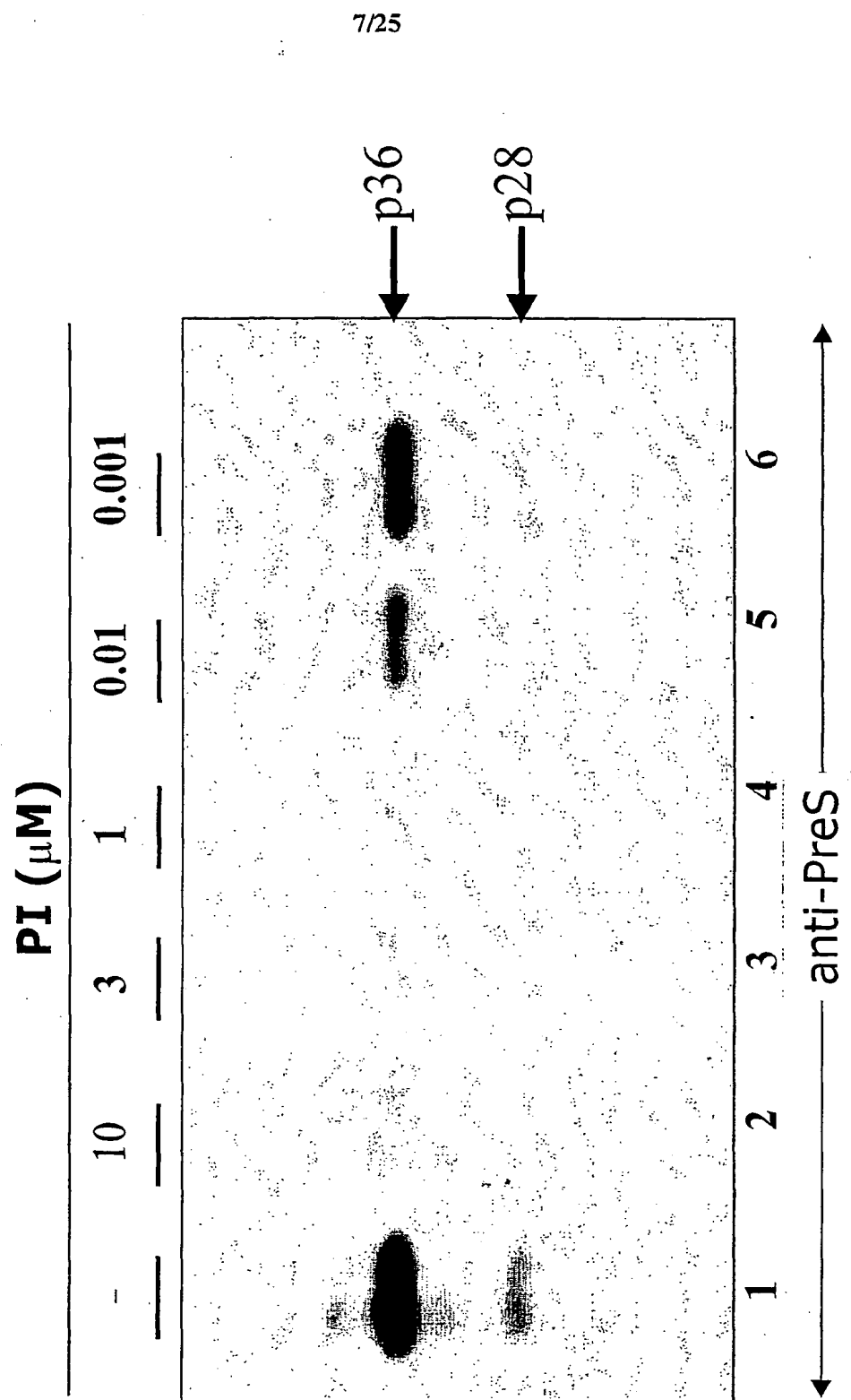
ERSATZBLATT (REGEL 26)

6/25

Figur 6



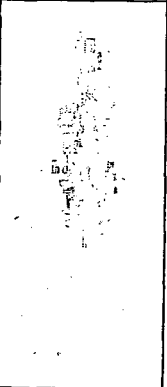
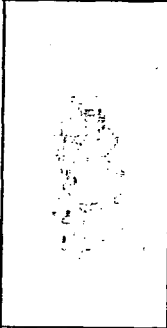
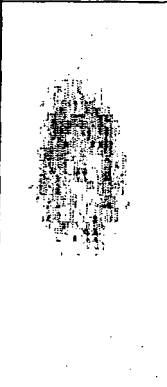
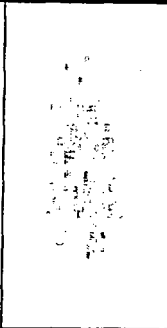
Figur 7



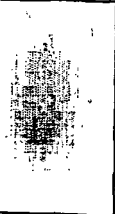






8/25

Figur 8

PI-Behandlung

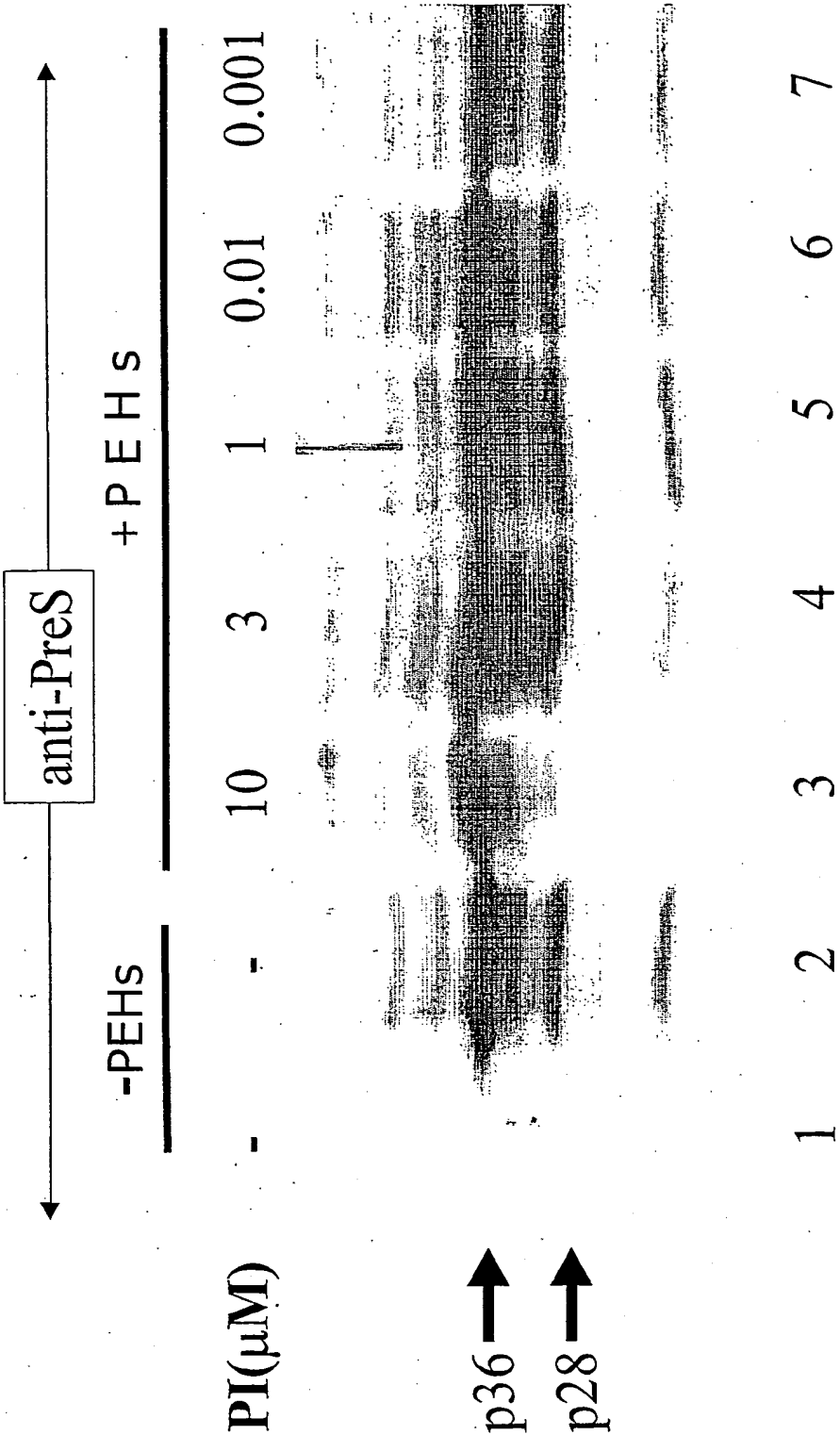
| 1µm PI  | 10µm PI   | -PEH |
|---|---|------|
|  |  | - PI |
|  |  | - PI |

DHBV - DNA Standard

| 4 pg  | 2pg   | 1pg   | 0,5 pg   | 0,25 pg   | 0,125 pg  | 0 pg  |
|---|---|---|--|---|---|---|
|  |  |  |  |  |  |  |

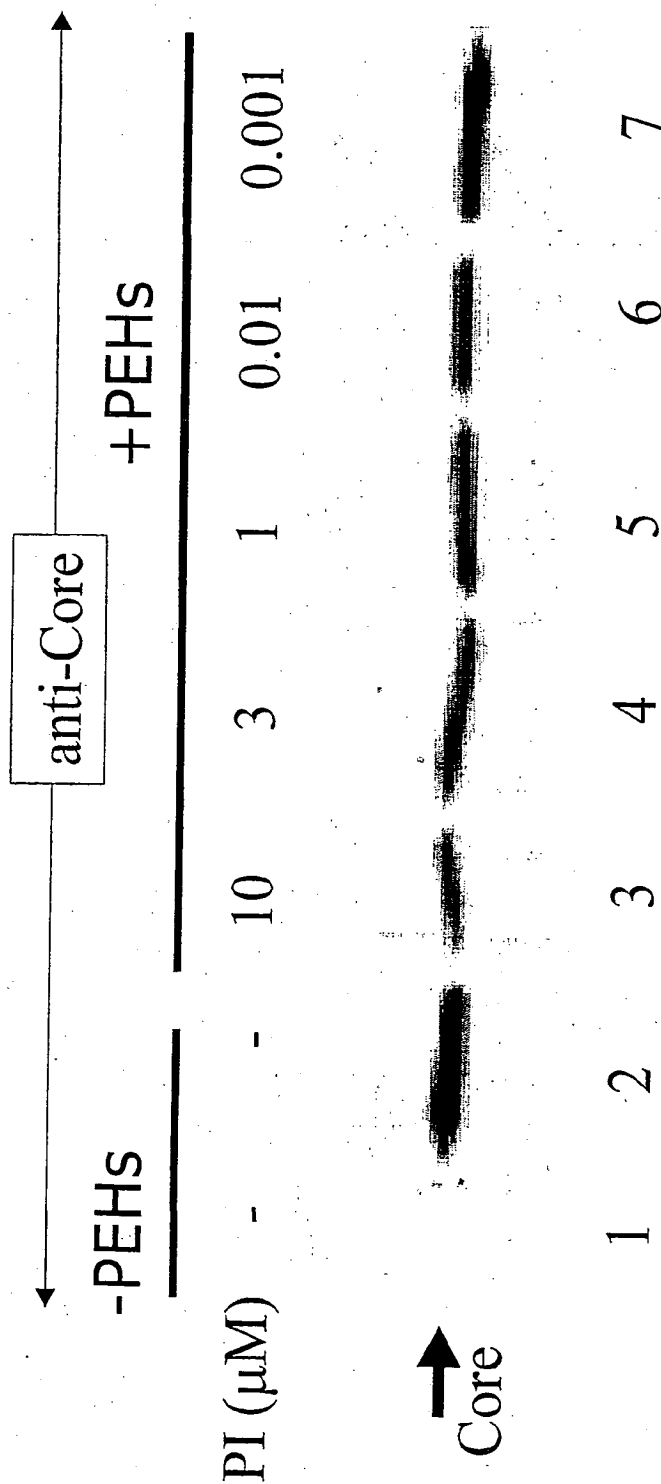
9/25

Figur 9



10/25

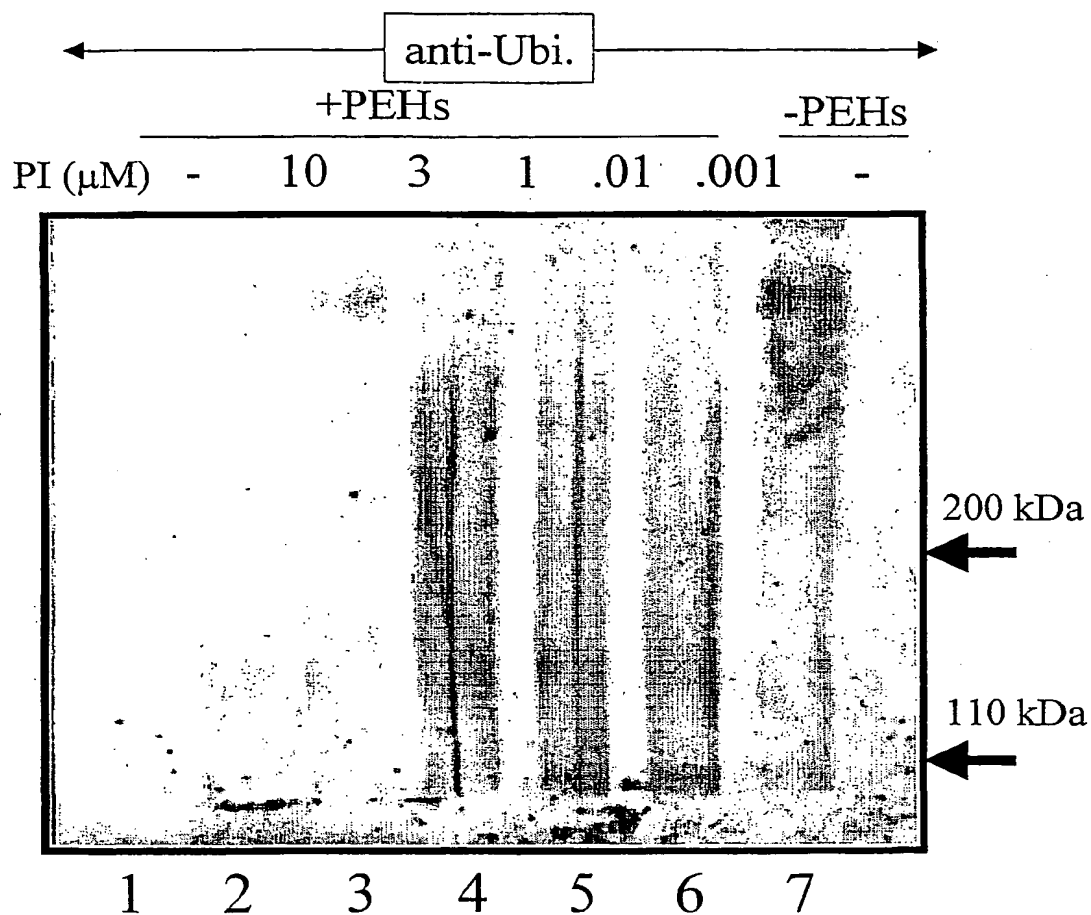
Figur 10



ERSATZBLATT (REGEL 26)

11/25

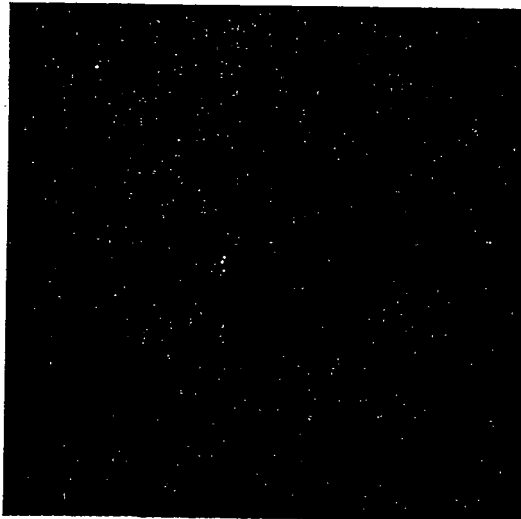
Figur 11



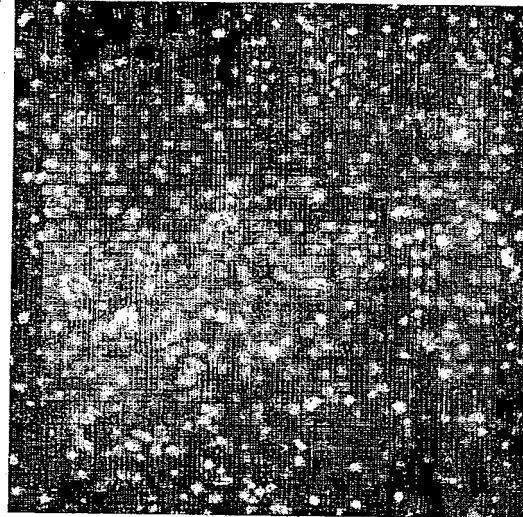
12/25

Figur 12

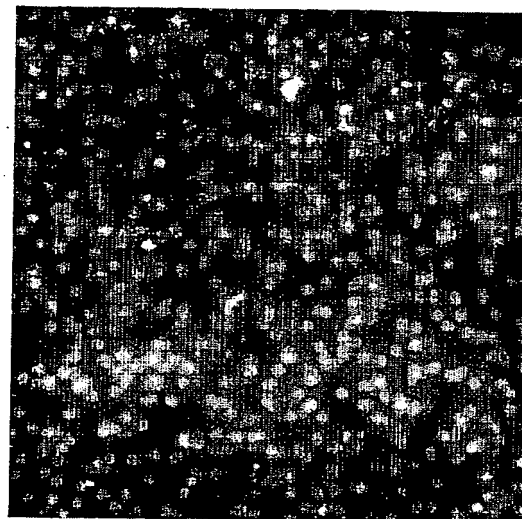
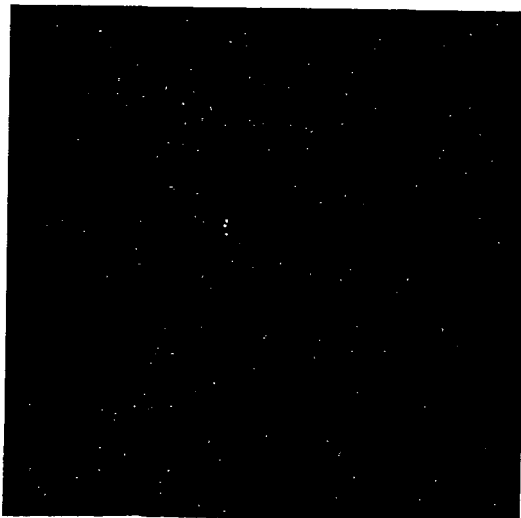
Niedrige Vergrößerung



PreS



Hoechst und PreS Merge



Höhere Vergrößerung

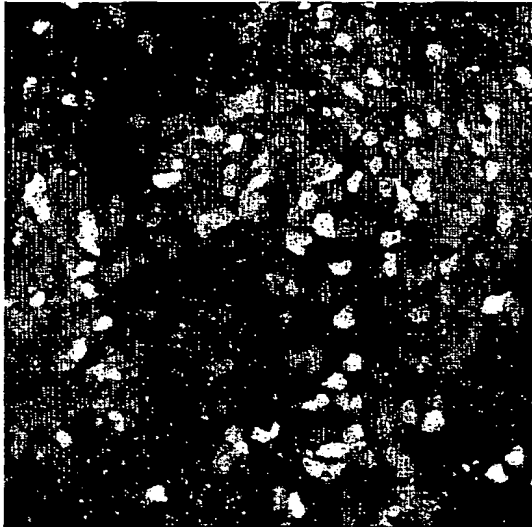
ERSATZBLATT (REGEL 26)



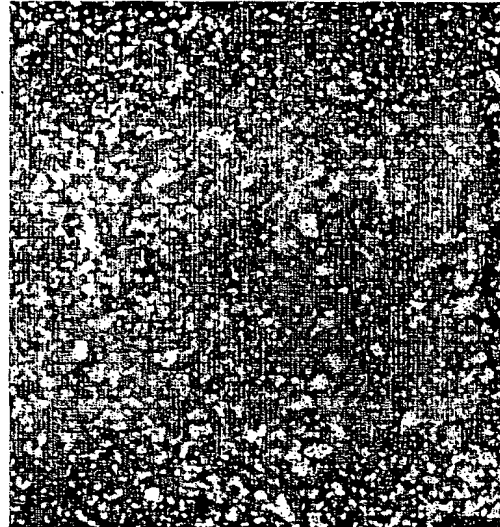
13/25

Figur 13

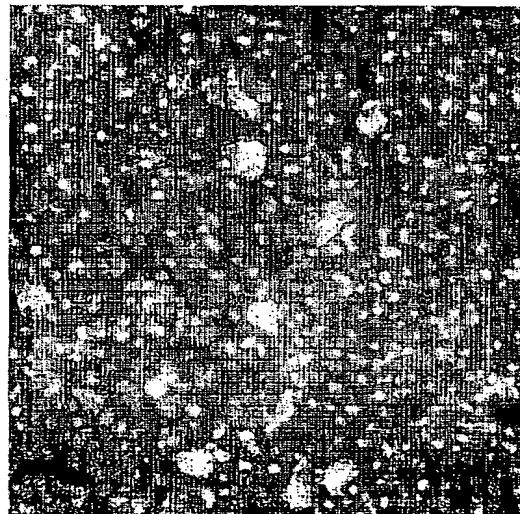
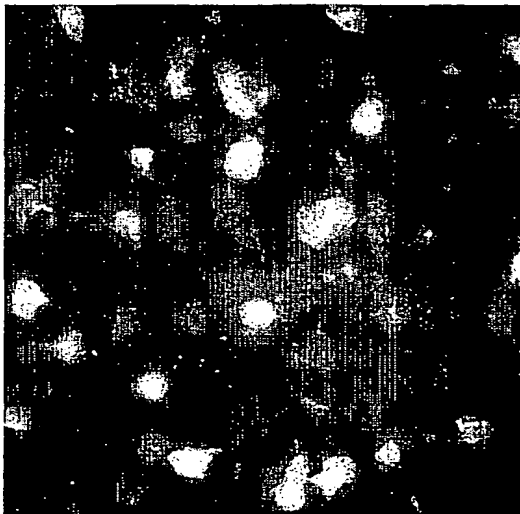
Niedrige Vergrößerung



PreS



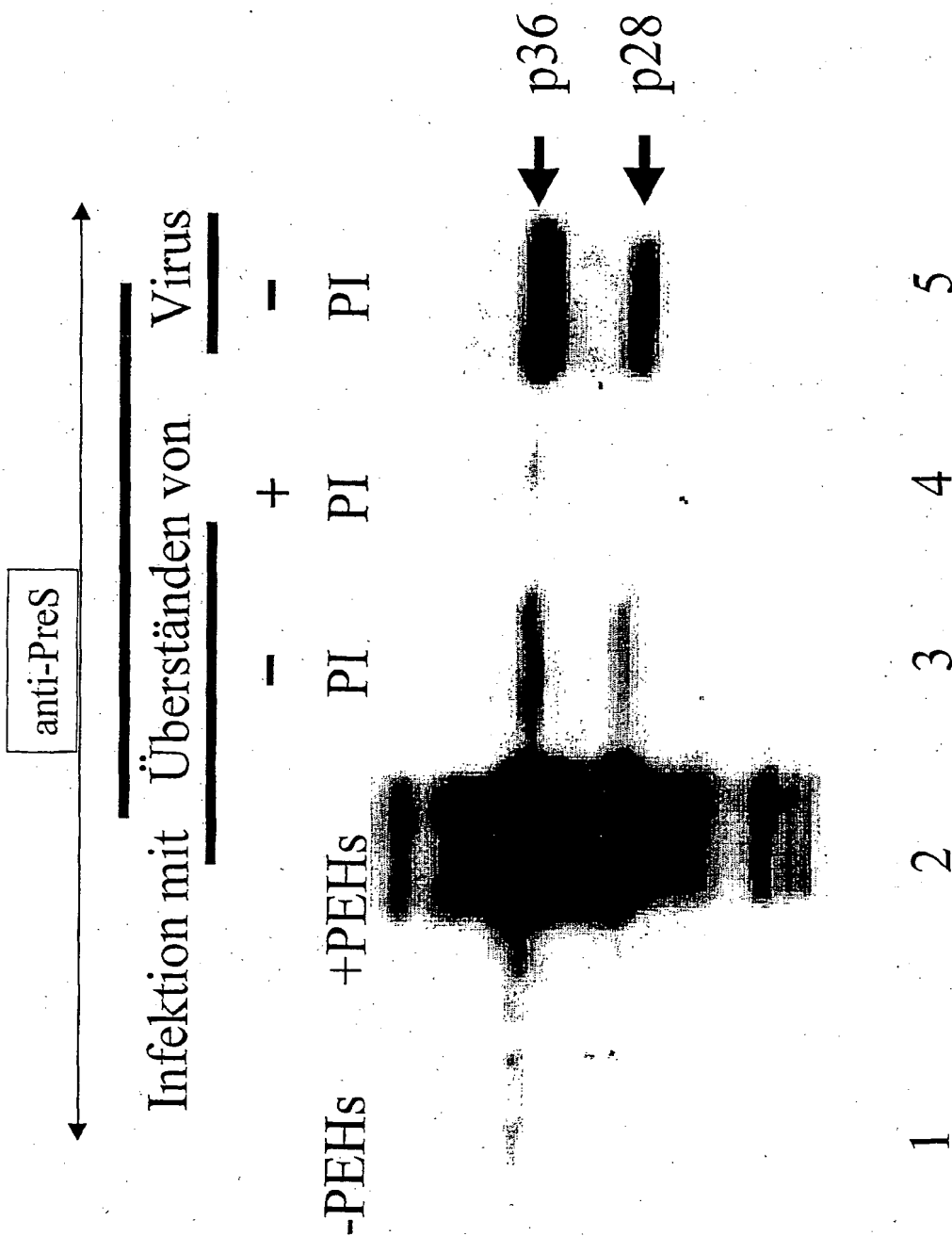
Hoechst und PreS Merge



Höhere Vergrößerung

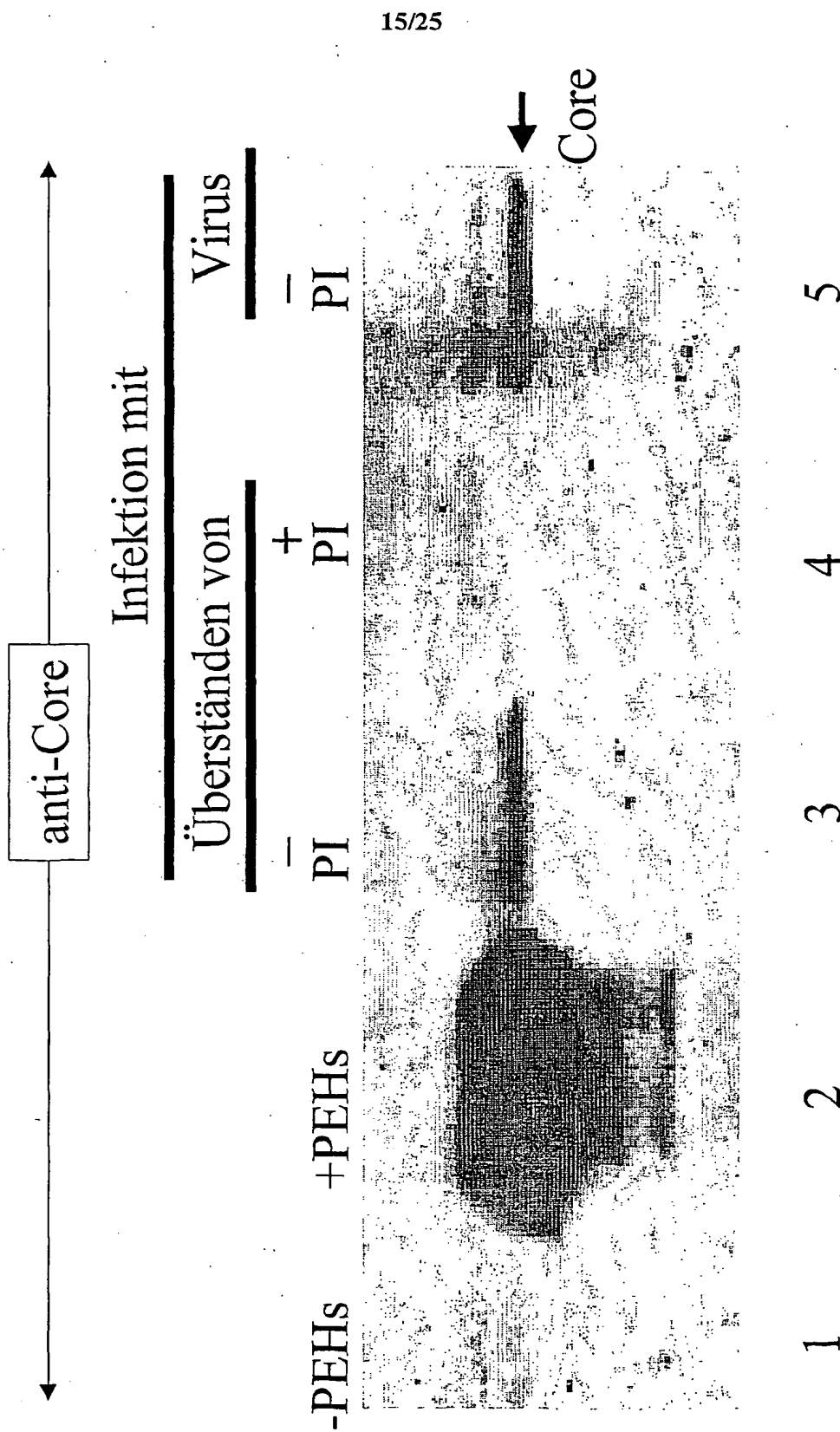
14/25

Figur 14



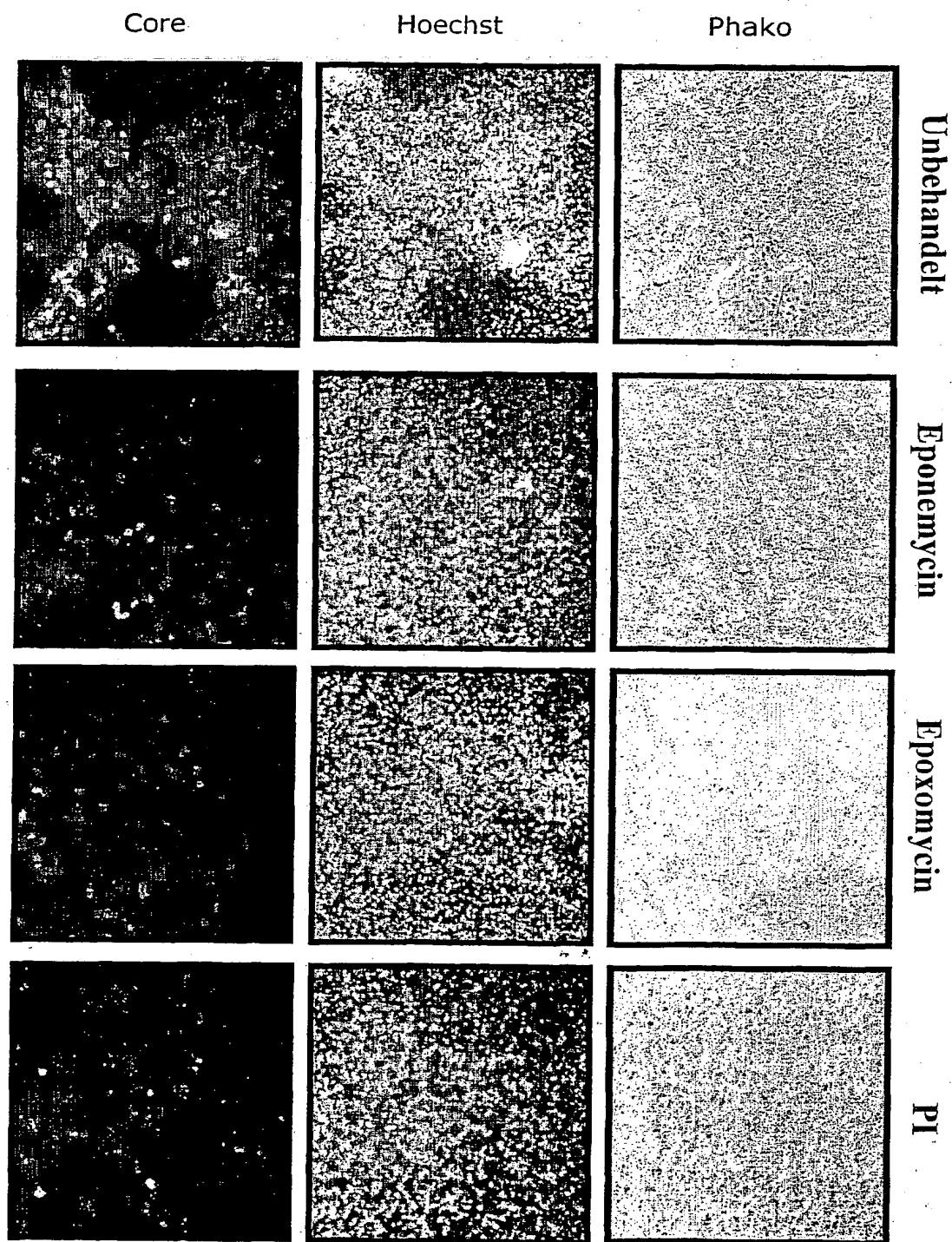
ERSATZBLATT (REGEL 26).

Figur 15



16/25

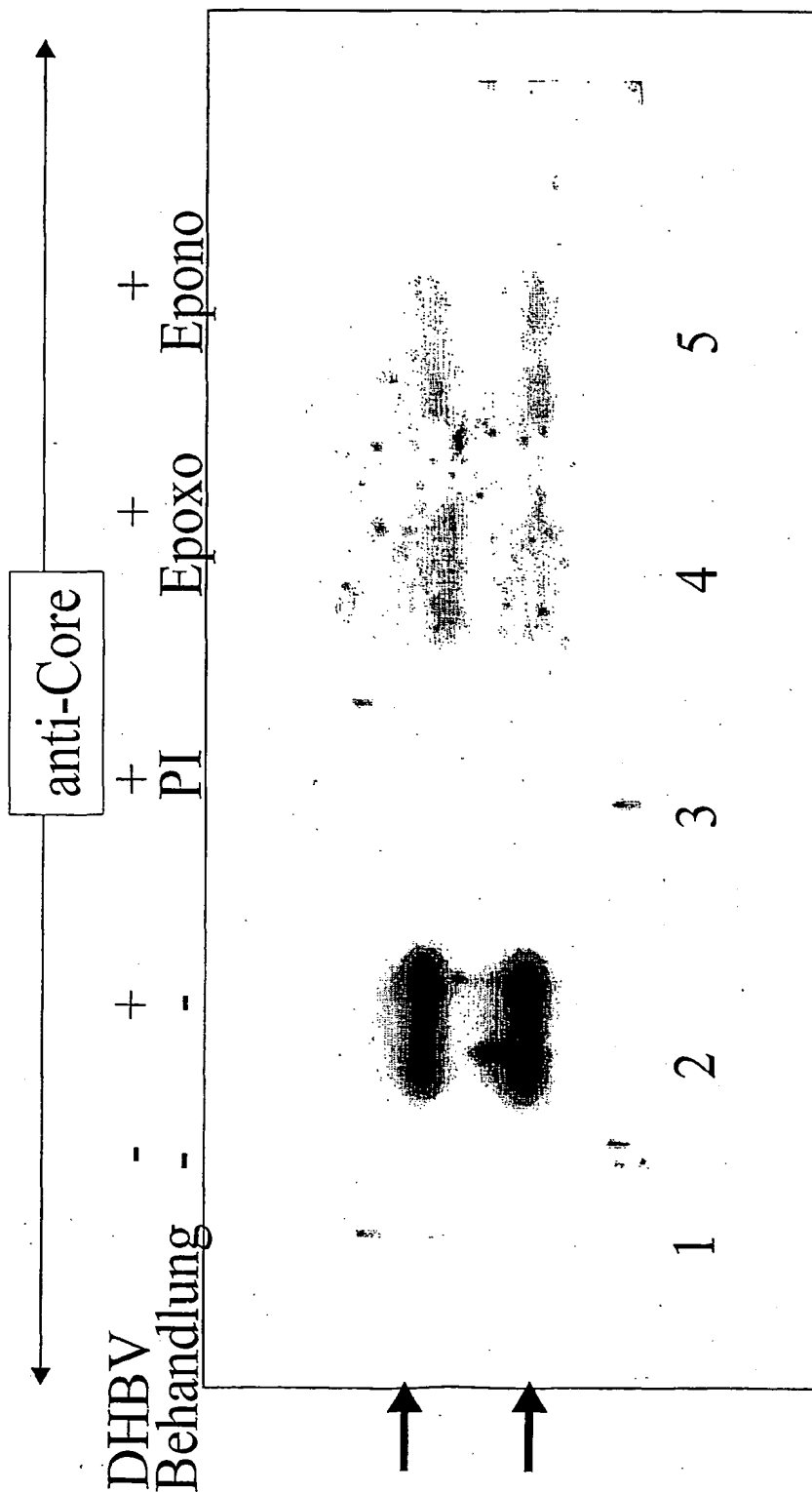
Figur 16



ERSATZBLATT (REGEL 26)

17/25

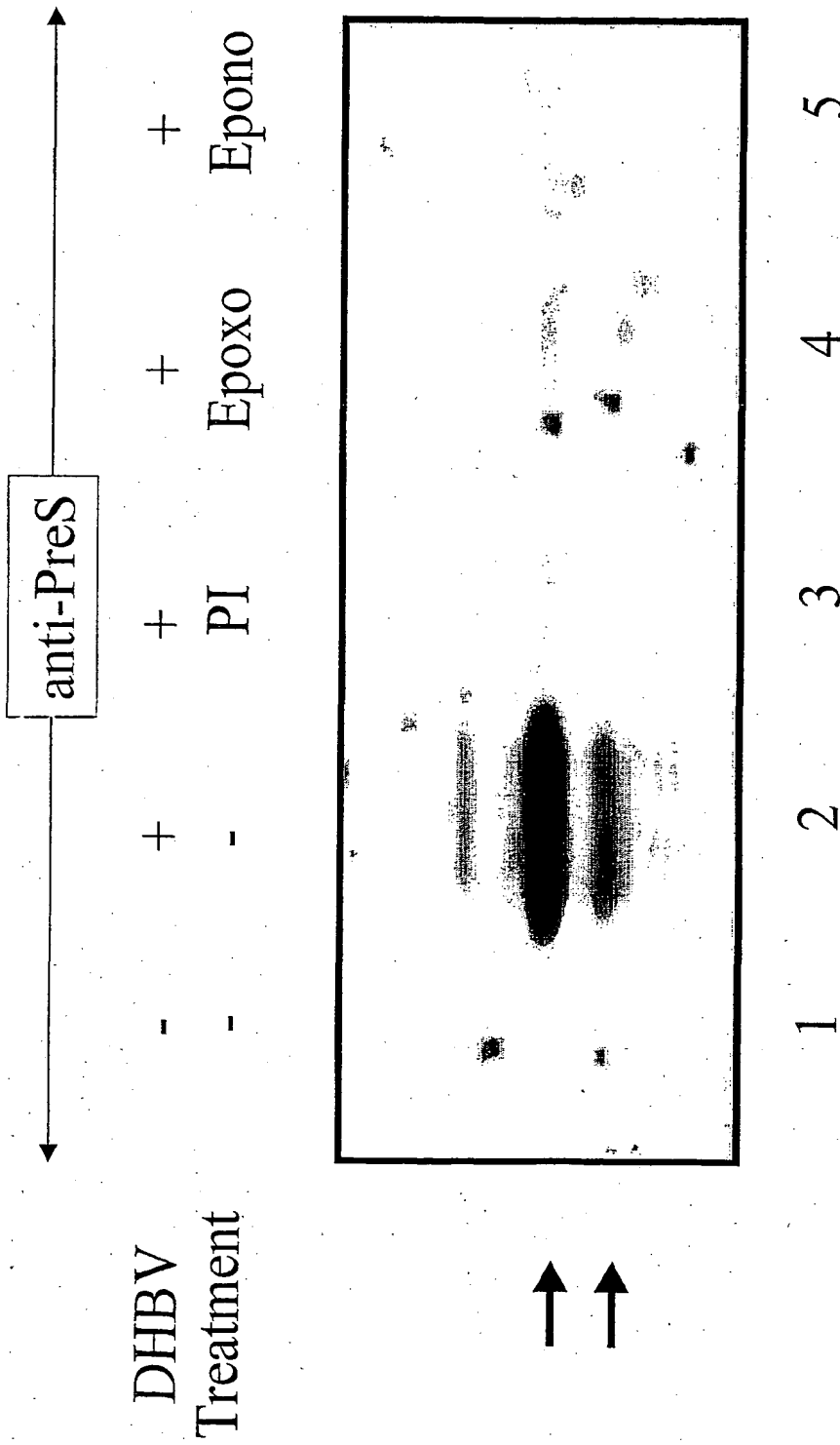
Figur 17



ERSATZBLATT (REGEL-26)

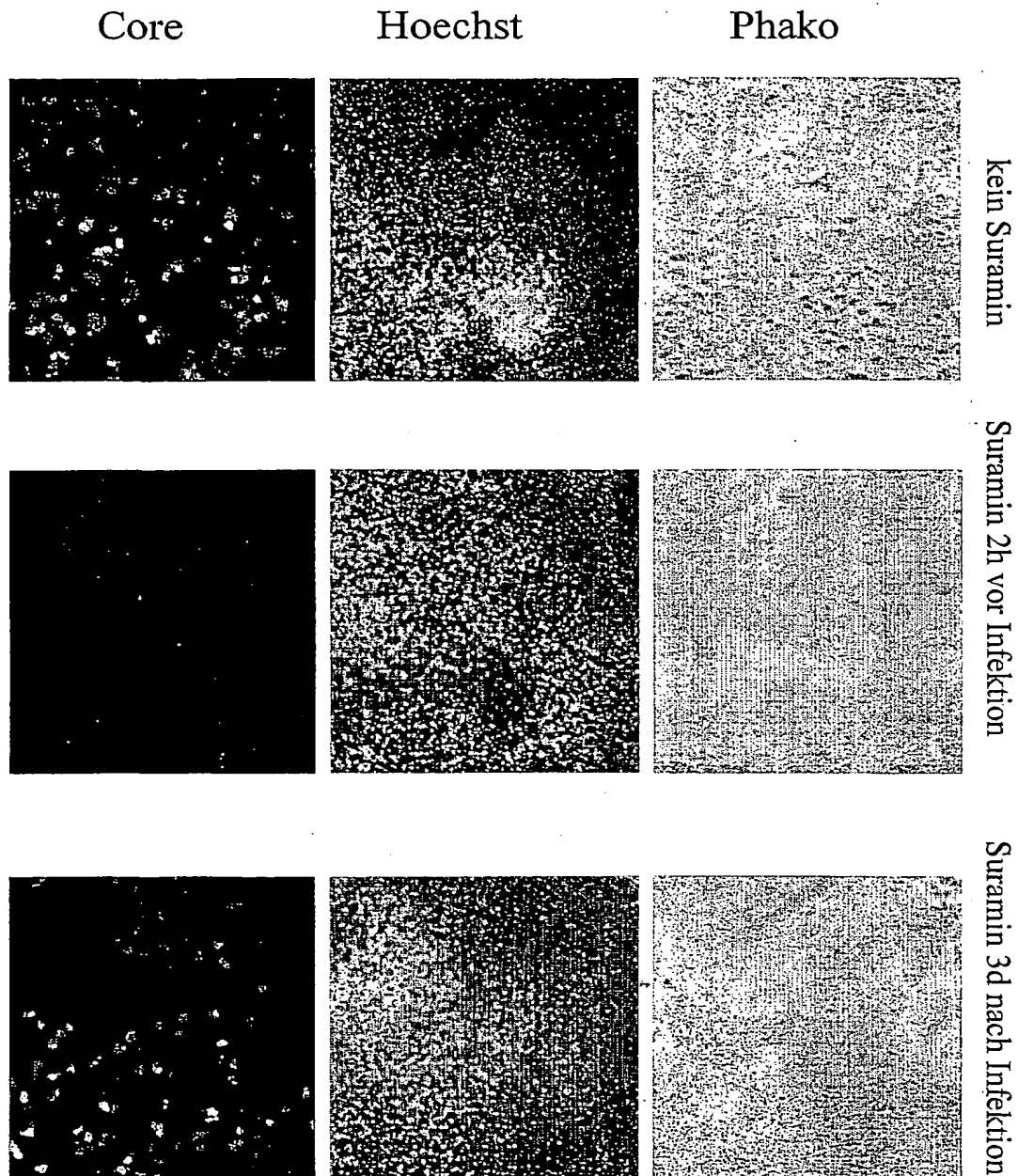
18/25

Figur 18

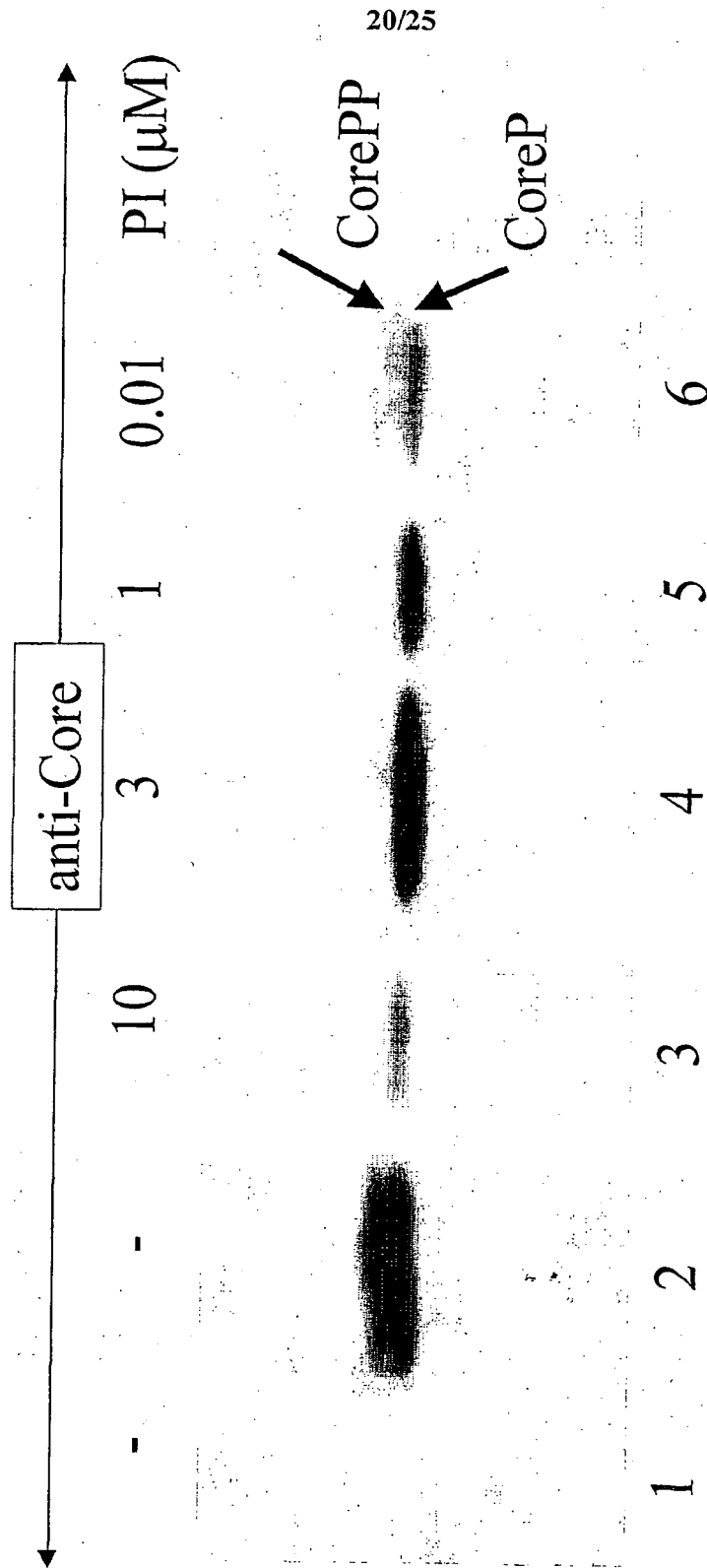


19/25

Figur 19

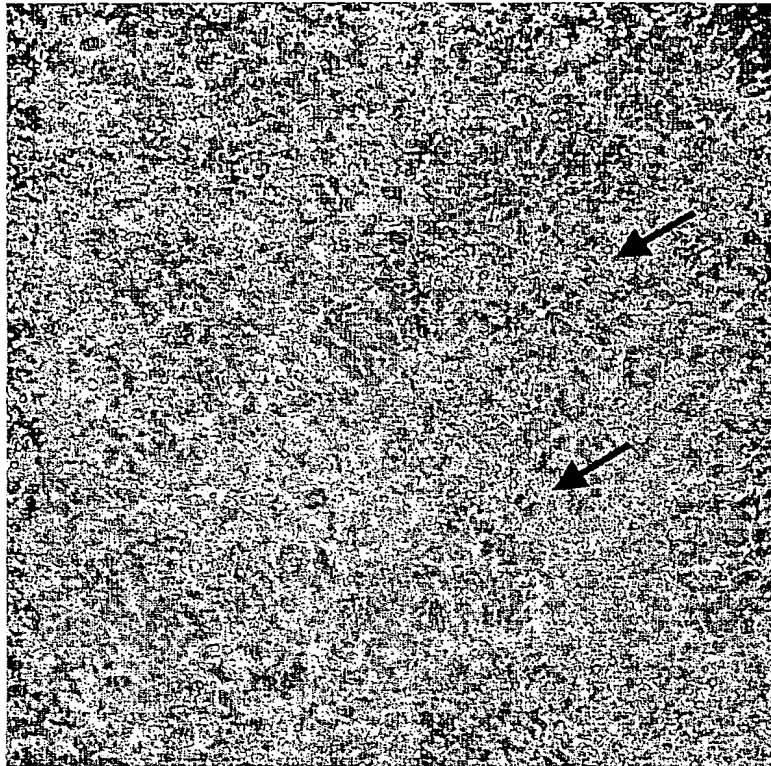


Figur 20

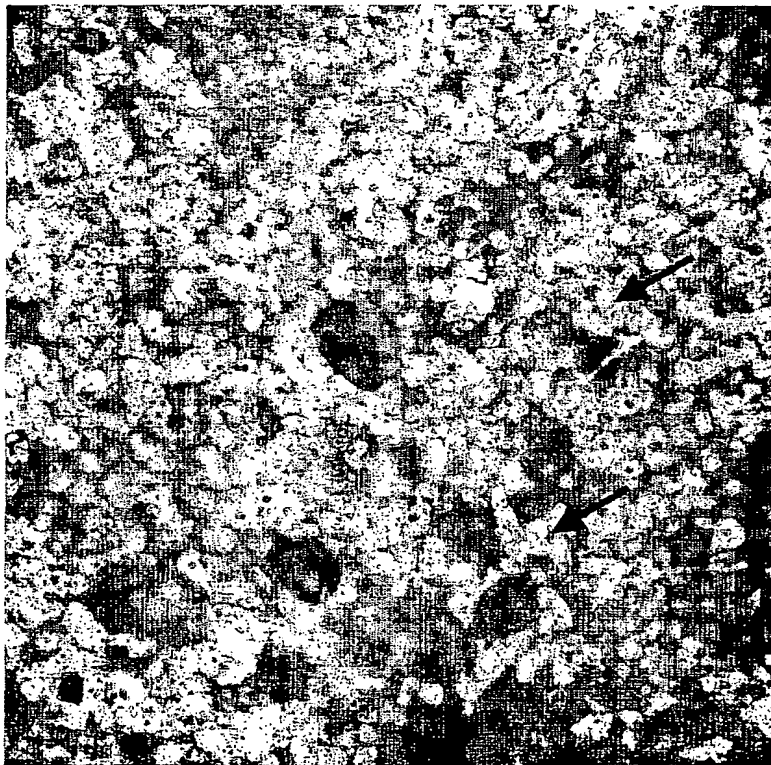




21/25



Phasenkontrast



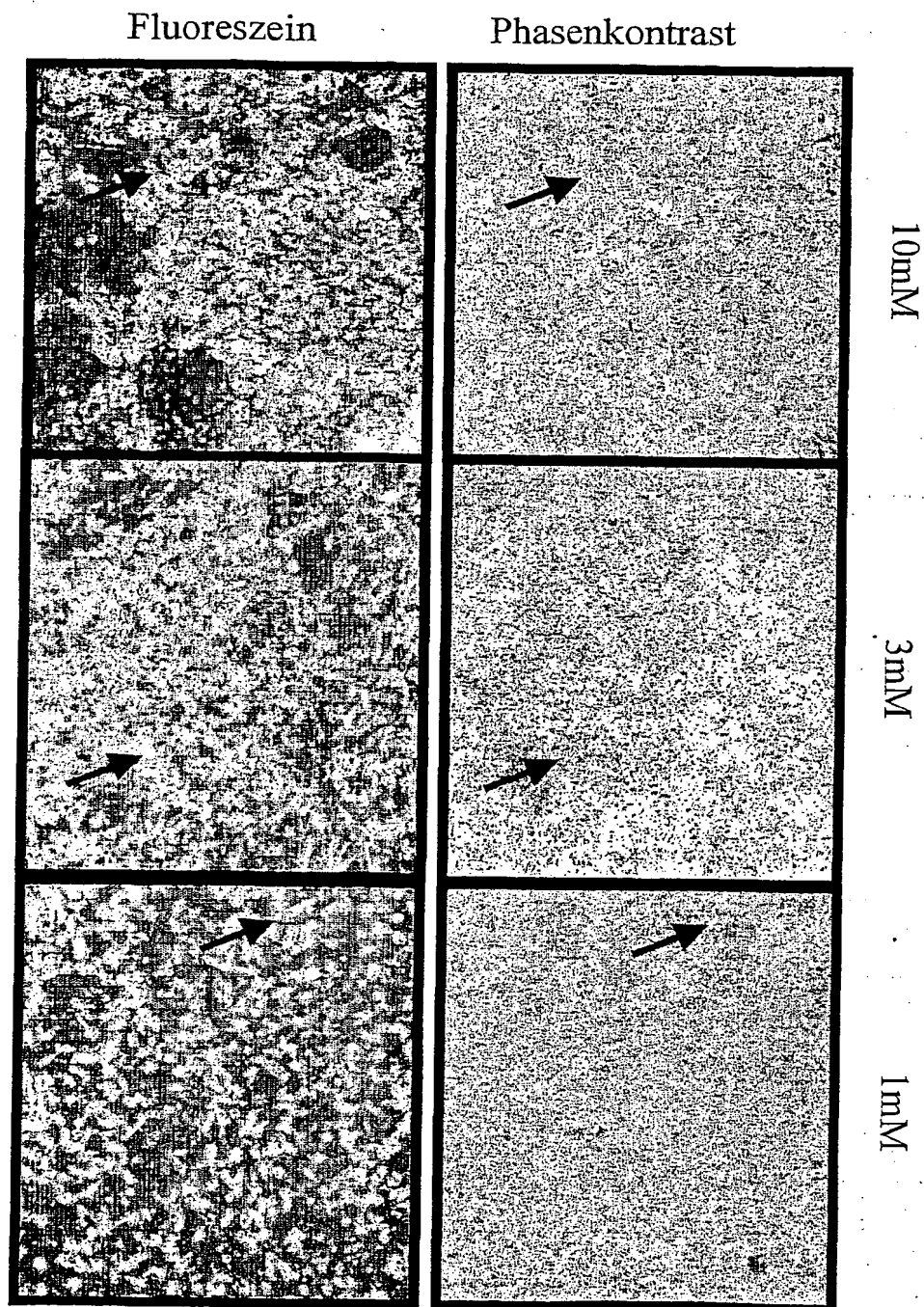
Fluoreszenz

Figur 21

ERSATZBLATT (REGEL 26)

22/25

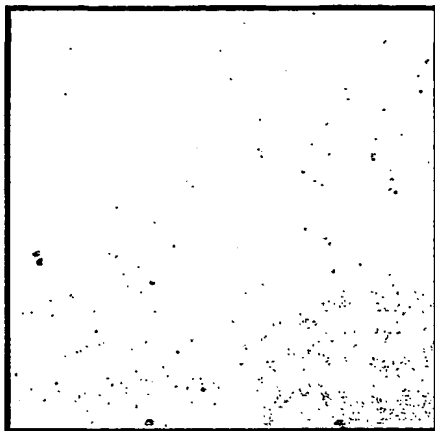
Figur 22



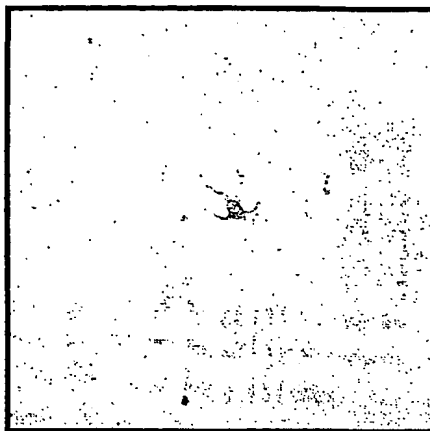
ERSATZBLATT (REGEL 26)

23/25

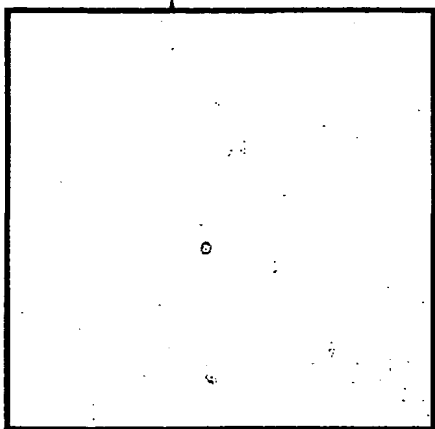
**Figur 23**



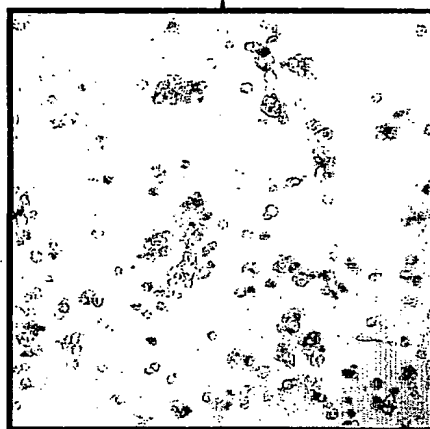
10 $\mu$ M



3 $\mu$ M



1 $\mu$ M



100nM



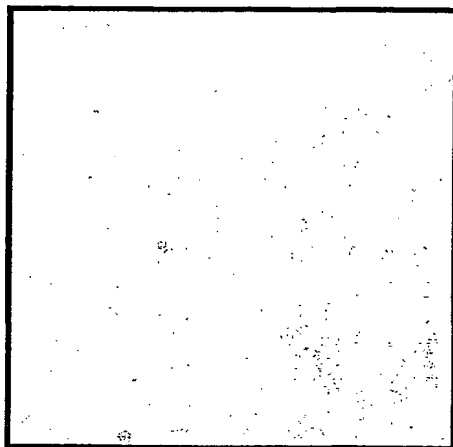
10nm



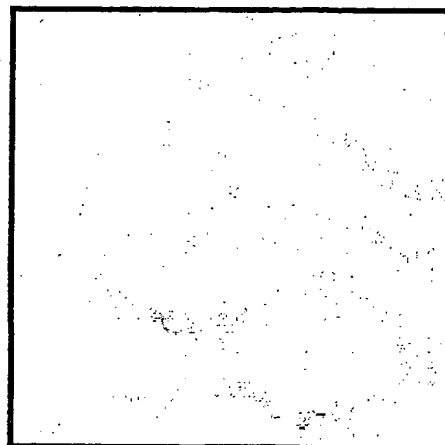
1nm

Figur 24

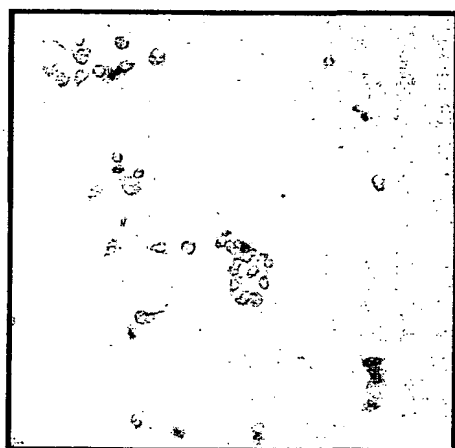
24/25



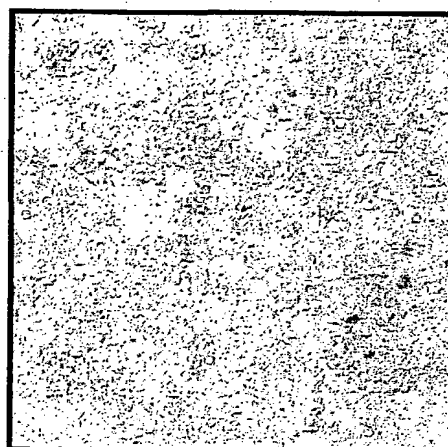
10 $\mu$ M



3 $\mu$ M



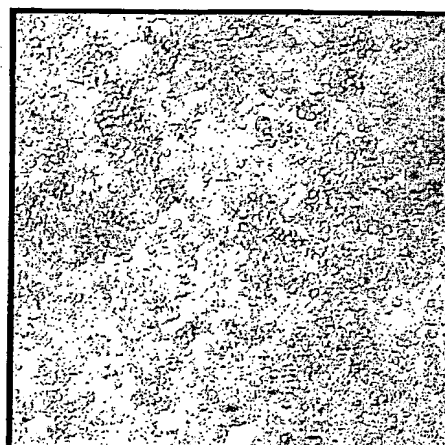
1 $\mu$ M



100nM



10nM

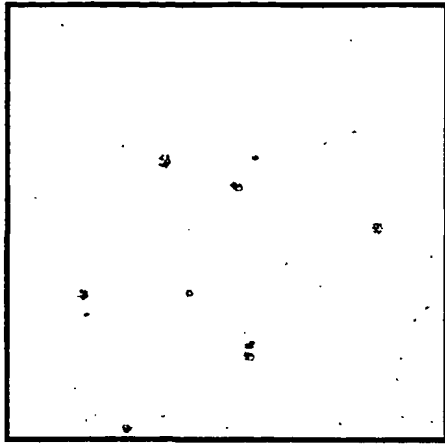
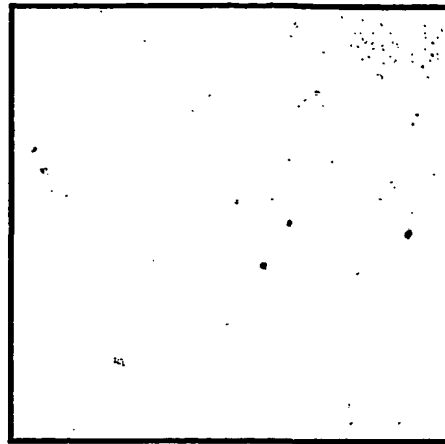
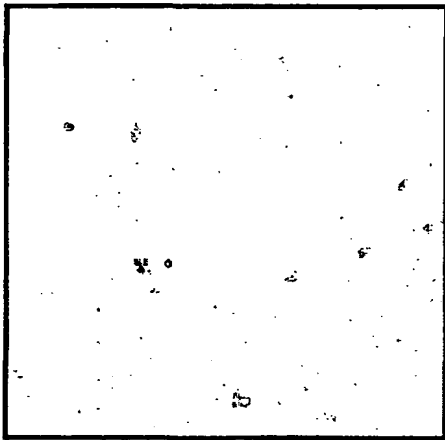
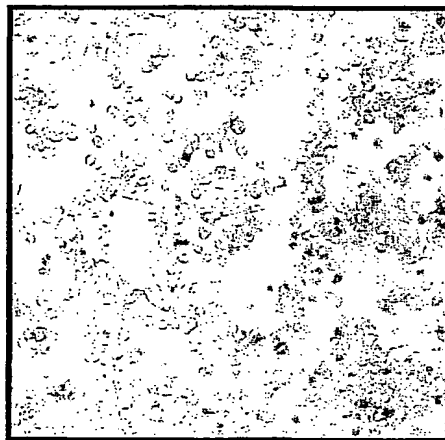


1nM

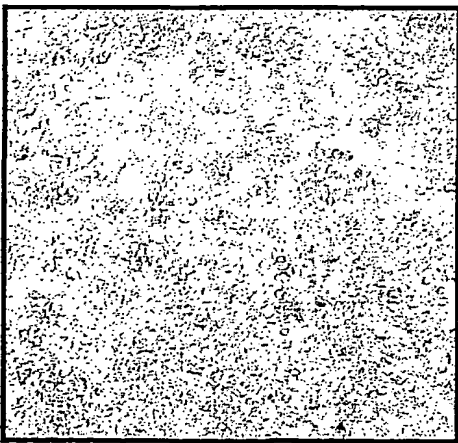
ERSATZBLATT (REGEL 26)

25/25

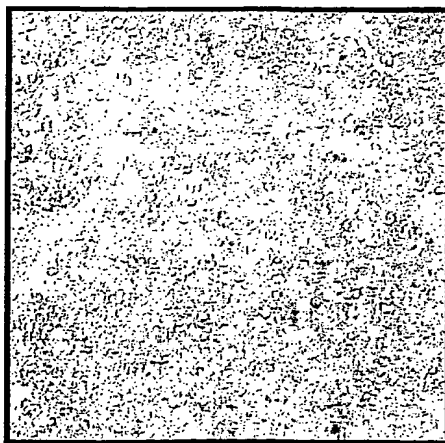
Figur 25

10 $\mu$ M3 $\mu$ M1 $\mu$ M

100nM



10nM



1nM

ERSATZBLATT (REGEL 26)



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum:  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. April 2002 (18.04.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/030455 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 38/58**,  
31/00, 38/06, 38/07, 38/05, 38/04, 31/365, 31/704,  
31/4015, 31/407, 31/415, 31/336, 31/5375, 31/47, 31/166,  
A61P 31/12, 31/20, 31/18, 31/14, 25/28, 43/00, 35/00,  
1/16 // A61K 48/00

Ortsstrasse Nr. 51, 07407 Uhlstädt (DE). **HOHENBERG**,  
Heinz [DE/DE]; Schillerstrasse 23, 22767 Hamburg (DE).

(74) Anwalt: **WEHLAN, Helmut**; Paul-Gesche-Strasse 1,  
10315 Berlin (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03908

(22) Internationales Anmeldedatum:  
11. Oktober 2001 (11.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 51 716.1 12. Oktober 2000 (12.10.2000) DE  
101 49 398.3 3. Oktober 2001 (03.10.2001) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **SCHUBERT, Ulrich** [DE/DE]; Ortsstrasse Nr.  
51, 07407 Uhlstädt (DE). **WILL, Hans** [DE/DE]; Paul-  
Sorge-Strasse 60a, 22549 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **TESSMER, Uwe**  
[DE/DE]; Roonstrasse 39, 20253 Hamburg (DE). **SIRMA**,  
**Hüsseyin** [DE/DE]; Beethovenstrasse 3/8, 69168 Wiesloch  
(DE). **PRASSLOW, Alexij** [RU/DE]; Münsterstrasse  
34, 22529 Hamburg (DE). **SCHUBERT, Evelyn** [DE/DE];

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,  
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,  
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 8. August 2002

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: AGENTS FOR THE TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR BEHANDLUNG VON VIRUS-INFEKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to agents for the treatment of viral infections, in particular, infections with hepatitis and retro-viruses. Said agents inhibit the release, maturation and replication of both retro-viruses and also hepatitis viruses. In the example of human immune deficiency virus (HIV) and hepatitis-B viruses it has been shown that proteasome inhibitors block the release of virus particles and the infectiousness of the released viral particles and thus the reproduction of the viruses. The proteasome inhibitors affect the activities in the ubiquitin/proteasome pathway, in particular the enzymatic activities of the 26S and the 20S proteasome complexes. The application for the above invention lies in anti-retroviral therapy, particularly the treatment of HIV infections and AIDS and in the anti-viral therapy of hepatitis infections, in particular the treatment of acute and chronic HBV and HCV infections and the associated liver carcinomas.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Mittel zur Behandlung von Virus-Infektionen, insbesondere von Infektionen mit Hepatitis- und Retroviren. Gegenstand der Erfindung sind Mittel zur Hemmung der Freisetzung, der Reifung und der Replikation sowohl von Retroviren als auch von Hepatitisviren. Am Beispiel der Humanen Immundefizienzviren (HIV) und von Hepatitis-B-Viren wird gezeigt, dass Proteasom-Inhibitoren die Freisetzung von Viruspartikeln sowie die Infektiosität der freigesetzten Viruspartikel und damit die Virusvermehrung blockieren. Die Proteasom-Inhibitoren beeinflussen die Aktivitäten des Ubiquitin/Proteasom-Pa-thway, insbesondere die enzymatischen Aktivitäten des 26S und des 20S Proteasom-Komplexes. Die Anwendung der Erfindung liegt in der anti-retrovirale Therapie, speziell der Behandlung von HIV-Infektionen und AIDS, sowie in der anti-viralen Therapie von Hepatitis-Infektionen, speziell der Behandlung von akuten und chronischen HBV- und HCV-Infektionen und damit assoziierter Leberkarzinome.

WO 02/030455 A3



*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/03908

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/58 A61K31/00 A61K38/06 A61K38/07 A61K38/05  
 A61K38/04 A61K31/365 A61K31/704 A61K31/4015 A61K31/407  
 A61K31/415 A61K31/336 A61K31/5375 A61K31/47 A61K31/166

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| P, Y       | WO 01 46448 A (UNIV TEXAS)<br>28 June 2001 (2001-06-28)<br>claims 1,9,17,18<br>page 28; example II<br>page 4, line 22 - line 30 | 1-10,<br>42-47        |
| X          | EP 0 652 290 A (YISSUM RES DEV CO)<br>10 May 1995 (1995-05-10)<br>claims 11,16-20   | 1-10,<br>41-47        |
| X          | US 6 083 903 A (GRENIER LOUIS ET AL)<br>4 July 2000 (2000-07-04)<br>column 15, line 50 - line 64<br>tables 1,2,4,5<br>claim 36  | 1-10,<br>42-47        |
|            | -/--  |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 May 2002

Date of mailing of the international search report

28/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giacobbe, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/03908

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61P31/12 A61P31/20 A61P31/18 A61P31/14 A61P25/28  
 A61P43/00 A61P35/00 A61P1/16 //A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | WO 99 54317 A (CORTECH INC)<br>28 October 1999 (1999-10-28)<br>table 2<br>claims 1-6<br>---   | 1-10,<br>42-47        |
| X          | WO 00 33654 A (UNIV MARYLAND BIOTECH INST)<br>15 June 2000 (2000-06-15)<br>page 10, line 22 - line 25<br>page 11, line 10 - line 12<br>page 26, line 13 - line 21<br>claims 5,9,27-29<br>---            | 1-10,<br>42-47        |
| X          | WO 96 32105 A (HARVARD COLLEGE ; SCHREIBER<br>STUART L (US); STANDAERT ROBERT F (US);)<br>17 October 1996 (1996-10-17)<br>page 2, line 1 - page 14, line 15<br>page 84, line 8 - line 22<br>---<br>-/-- | 1-10,<br>42-47        |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 May 2002

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giacobbe, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/03908

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y          | SCHUBERT U ET AL: "CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway"<br>JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US,<br>vol. 72, no. 3, March 1998 (1998-03),<br>pages 2280-2288, XP002121469<br>ISSN: 0022-538X<br>abstract | 1-10,<br>42-47        |
| Y          | EVERETT ROGER D: "A surprising role for the proteasome in the regulation of herpesvirus infection."<br>TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES,<br>vol. 24, no. 8, August 1999 (1999-08),<br>pages 293-295, XP004174246<br>ISSN: 0968-0004<br>abstract<br>page 293, column 3, paragraph 2  | 1-10,<br>42-47        |
| Y          | EVERETT R.D., ET AL.: "A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway"<br>THE EMBO JOURNAL,<br>vol. 17, no. 24, 1998, pages 7161-7169,<br>XP002196934<br>the whole document  | 1-10,<br>42-47        |
| Y          | FINE S M ET AL: "Proteasome blockers inhibit TNF-alpha release by lipopolysaccharide stimulated macrophages and microglia: implications for HIV-1 dementia."<br>JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, (1999 MAR 1)<br>95 (1-2) 55-64. ,<br>XP001069595<br>abstract  | 1-10,<br>43-45        |
| Y          | FUJITA K ET AL: "Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors."<br>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, (1997 MAR) 78<br>( PT 3) 619-25. ,<br>XP001069588<br>abstract   | 1-10,<br>42-47        |
| A          | ELLIOTT P.J. ET AL: "Recent advances in understanding proteasome function."<br>CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, (1999) 2/5 (484-490). ,<br>XP001070303<br>the whole document  | 1-10,<br>42-47        |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/03908

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 0146448                                | A | 28-06-2001          | AU 2292101 A               | 03-07-2001          |
|   |   |                     | WO 0146448 A1              | 28-06-2001          |
|   |   |                     | US 2002049175 A1           | 25-04-2002          |
| EP 0652290                                | A | 10-05-1995          | CA 2131587 A1              | 08-03-1995          |
|   |   |                     | EP 0652290 A1              | 10-05-1995          |
|   |   |                     | JP 7170998 A               | 11-07-1995          |
| US 6083903                                | A | 04-07-2000          | AU 710564 B2               | 23-09-1999          |
|   |   |                     | AU 4139896 A               | 23-05-1996          |
|   |   |                     | CA 2203936 A1              | 09-05-1996          |
|   |   |                     | CN 1168633 A               | 24-12-1997          |
|   |   |                     | EP 0788360 A1              | 13-08-1997          |
|   |   |                     | FI 971746 A                | 06-06-1997          |
|   |   |                     | JP 10510245 T              | 06-10-1998          |
|   |   |                     | NO 971929 A                | 12-06-1997          |
|   |   |                     | NZ 296717 A                | 29-11-1999          |
|   |   |                     | NZ 337211 A                | 22-12-2000          |
|   |   |                     | US 6066730 A               | 23-05-2000          |
|   |   |                     | WO 9613266 A1              | 09-05-1996          |
|   |   |                     | US 6297217 B1              | 02-10-2001          |
|   |   |                     | US 5780454 A               | 14-07-1998          |
|   |   |                     | ZA 9509119 A               | 27-05-1996          |
| WO 9954317                                | A | 28-10-1999          | US 6004933 A               | 21-12-1999          |
|   |   |                     | AU 3965199 A               | 08-11-1999          |
|   |   |                     | CA 2329712 A1              | 28-10-1999          |
|   |   |                     | EP 0979242 A2              | 16-02-2000          |
|   |   |                     | WO 9849190 A2              | 05-11-1998          |
|   |   |                     | WO 9954317 A1              | 28-10-1999          |
| WO 0033654                                | A | 15-06-2000          | AU 1930900 A               | 26-06-2000          |
|   |   |                     | WO 0033654 A1              | 15-06-2000          |
| WO 9632105                                | A | 17-10-1996          | US 6335358 B1              | 01-01-2002          |
|   |   |                     | AU 705791 B2               | 03-06-1999          |
|   |   |                     | AU 5542396 A               | 30-10-1996          |
|   |   |                     | CA 2217817 A1              | 17-10-1996          |
|   |   |                     | EP 0820283 A1              | 28-01-1998          |
|   |   |                     | JP 11503732 T              | 30-03-1999          |
|   |   |                     | NZ 306775 A                | 28-10-1999          |
|   |   |                     | WO 9632105 A1              | 17-10-1996          |
|   |   |                     | US 5756764 A               | 26-05-1998          |
|   |   |                     | US 6147223 A               | 14-11-2000          |
|   |   |                     | US 6214862 B1              | 10-04-2001          |

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K38/58 A61K31/00 A61K38/06 A61K38/07 A61K38/05  
 A61K38/04 A61K31/365 A61K31/704 A61K31/4015 A61K31/407  
 A61K31/415 A61K31/336 A61K31/5375 A61K31/47 A61K31/166

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                       | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| P,Y        | WO 01 46448 A (UNIV TEXAS)<br>28. Juni 2001 (2001-06-28)<br>Ansprüche 1,9,17,18<br>Seite 28; Beispiel II<br>Seite 4, Zeile 22 - Zeile 30 | 1-10,<br>42-47     |
| X          | EP 0 652 290 A (YISSUM RES DEV CO)<br>10. Mai 1995 (1995-05-10)<br>Ansprüche 11,16-20  | 1-10,<br>41-47     |
| X          | US 6 083 903 A (GRENIER LOUIS ET AL)<br>4. Juli 2000 (2000-07-04)<br>Spalte 15, Zeile 50 - Zeile 64<br>Tabellen 1,2,4,5<br>Anspruch 36   | 1-10,<br>42-47     |
|            | -/--   |                    |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Mai 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

28/05/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Giacobbe, S

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61P31/12 A61P31/20 A61P31/18 A61P31/14 A61P25/28  
 A61P43/00 A61P35/00 A61P1/16 //A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie <sup>a</sup> | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|--|--------------------|
| X                      | WO 99 54317 A (CORTECH INC)<br>28. Oktober 1999 (1999-10-28)<br>Tabelle 2<br>Ansprüche 1-6<br>----   | 1-10,<br>42-47     |
| X                      | WO 00 33654 A (UNIV MARYLAND BIOTECH INST)<br>15. Juni 2000 (2000-06-15)<br>Seite 10, Zeile 22 - Zeile 25<br>Seite 11, Zeile 10 - Zeile 12<br>Seite 26, Zeile 13 - Zeile 21<br>Ansprüche 5,9,27-29<br>----       | 1-10,<br>42-47     |
| X                      | WO 96 32105 A (HARVARD COLLEGE ; SCHREIBER<br>STUART L (US); STANDAERT ROBERT F (US);)<br>17. Oktober 1996 (1996-10-17)<br>Seite 2, Zeile 1 - Seite 14, Zeile 15<br>Seite 84, Zeile 8 - Zeile 22<br>-----<br>-/- | 1-10,<br>42-47     |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>a</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Mai 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Giacobbe, S

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN |  |                    |
|--|--|--------------------|
| Kategorie*   | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
| Y  | <p>SCHUBERT U ET AL: "CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway"</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US,<br/>Bd. 72, Nr. 3, März 1998 (1998-03), Seiten 2280-2288, XP002121469<br/>ISSN: 0022-538X<br/>Zusammenfassung</p> | 1-10,<br>42-47     |
| Y  | <p>EVERETT ROGER D: "A surprising role for the proteasome in the regulation of herpesvirus infection."</p> <p>TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES,<br/>Bd. 24, Nr. 8, August 1999 (1999-08),<br/>Seiten 293-295, XP004174246<br/>ISSN: 0968-0004<br/>Zusammenfassung<br/>Seite 293, Spalte 3, Absatz 2</p>  | 1-10,<br>42-47     |
| Y  | <p>EVERETT R.D., ET AL.: "A viral activator of gene expression functions via the ubiquitin-proteasome pathway"</p> <p>THE EMBO JOURNAL,<br/>Bd. 17, Nr. 24, 1998, Seiten 7161-7169,<br/>XP002196934<br/>das ganze Dokument</p>   | 1-10,<br>42-47     |
| Y  | <p>FINE S M ET AL: "Proteasome blockers inhibit TNF-alpha release by lipopolysaccharide stimulated macrophages and microglia: implications for HIV-1 dementia."</p> <p>JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY, (1999 MAR 1)<br/>95 (1-2) 55-64. ,<br/>XP001069595<br/>Zusammenfassung</p>  | 1-10,<br>43-45     |
| Y  | <p>FUJITA K ET AL: "Rapid degradation of CD4 in cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Env and Vpu is blocked by proteasome inhibitors."</p> <p>JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, (1997 MAR) 78<br/>( PT 3) 619-25. ,<br/>XP001069588<br/>Zusammenfassung</p>   | 1-10,<br>42-47     |
| A  | <p>ELLIOTT P.J. ET AL: "Recent advances in understanding proteasome function."</p> <p>CURRENT OPINION IN DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT, (1999) 2/5 (484-490). ,<br/>XP001070303<br/>das ganze Dokument</p>  | 1-10,<br>42-47     |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/03908

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |   | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 0146448   | A | 28-06-2001                    | AU 2292101 A                      | 03-07-2001                    |
|  |   |                               | WO 0146448 A1                     | 28-06-2001                    |
|  |   |                               | US 2002049175 A1                  | 25-04-2002                    |
| EP 0652290   | A | 10-05-1995                    | CA 2131587 A1                     | 08-03-1995                    |
|  |   |                               | EP 0652290 A1                     | 10-05-1995                    |
|  |   |                               | JP 7170998 A                      | 11-07-1995                    |
| US 6083903   | A | 04-07-2000                    | AU 710564 B2                      | 23-09-1999                    |
|  |   |                               | AU 4139896 A                      | 23-05-1996                    |
|  |   |                               | CA 2203936 A1                     | 09-05-1996                    |
|  |   |                               | CN 1168633 A                      | 24-12-1997                    |
|  |   |                               | EP 0788360 A1                     | 13-08-1997                    |
|  |   |                               | FI 971746 A                       | 06-06-1997                    |
|  |   |                               | JP 10510245 T                     | 06-10-1998                    |
|  |   |                               | NO 971929 A                       | 12-06-1997                    |
|  |   |                               | NZ 296717 A                       | 29-11-1999                    |
|  |   |                               | NZ 337211 A                       | 22-12-2000                    |
|  |   |                               | US 6066730 A                      | 23-05-2000                    |
|  |   |                               | WO 9613266 A1                     | 09-05-1996                    |
|  |   |                               | US 6297217 B1                     | 02-10-2001                    |
|  |   |                               | US 5780454 A                      | 14-07-1998                    |
|  |   |                               | ZA 9509119 A                      | 27-05-1996                    |
| WO 9954317   | A | 28-10-1999                    | US 6004933 A                      | 21-12-1999                    |
|  |   |                               | AU 3965199 A                      | 08-11-1999                    |
|  |   |                               | CA 2329712 A1                     | 28-10-1999                    |
|  |   |                               | EP 0979242 A2                     | 16-02-2000                    |
|  |   |                               | WO 9849190 A2                     | 05-11-1998                    |
|  |   |                               | WO 9954317 A1                     | 28-10-1999                    |
| WO 0033654   | A | 15-06-2000                    | AU 1930900 A                      | 26-06-2000                    |
|  |   |                               | WO 0033654 A1                     | 15-06-2000                    |
| WO 9632105   | A | 17-10-1996                    | US 6335358 B1                     | 01-01-2002                    |
|  |   |                               | AU 705791 B2                      | 03-06-1999                    |
|  |   |                               | AU 5542396 A                      | 30-10-1996                    |
|  |   |                               | CA 2217817 A1                     | 17-10-1996                    |
|  |   |                               | EP 0820283 A1                     | 28-01-1998                    |
|  |   |                               | JP 11503732 T                     | 30-03-1999                    |
|  |   |                               | NZ 306775 A                       | 28-10-1999                    |
|  |   |                               | WO 9632105 A1                     | 17-10-1996                    |
|  |   |                               | US 5756764 A                      | 26-05-1998                    |
|  |   |                               | US 6147223 A                      | 14-11-2000                    |
|  |   |                               | US 6214862 B1                     | 10-04-2001                    |